

Aus der Klinik für Klauentiere
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Charakterisierung der ovariellen Perfusion zyklischer Jungsauen
mittels transabdominaler farbkodierter Doppler-Sonographie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Rosa Stark
aus Frankfurt (Oder)

Leipzig, 2020

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Johannes Kauffold

Gutachter: Prof. Dr. Johannes Kauffold

Klinik für Klauentiere der Veterinärmedizinischen Fakultät der
Universität Leipzig

Prof. Dr. Axel Wehrend

Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie des Fachbereiches
Veterinärmedizin

Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Verteidigung: 09.06.2020

Für die beteiligten Jungsauen

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1 Der Sexualzyklus des Schweins	3
2.2 Blutversorgung der Ovarien des Schweins	4
2.2.1 Arteria und Vena ovarica	4
2.2.2 Arteria und Vena uterina	5
2.2.3 Arteria und Vena vaginalis	5
2.3 Grundlagen der B-Mode Sonographie	6
2.4 B-Mode Sonographie des porzinen Reproduktionstraktes	7
2.5 Grundlagen der Doppler-Sonographie	9
2.6 Doppler-Methoden	11
2.6.1 Continuous-wave Doppler-Sonographie	11
2.6.2 Pulsed-wave Doppler-Sonographie	12
2.6.3 Farbkodierte Doppler-Sonographie	12
2.6.4 Power Doppler-Sonographie	13
2.7 Dopplersonographische Untersuchungen der ovariellen Perfusion in der Veterinärmedizin	13
2.8 Untersuchungen der ovariellen Perfusion von Schweinen	14
2.9 Methoden zur Analyse dopplersonographisch erzeugter Daten	15
2.9.1 Qualitativ	15
2.9.2 Quantitativ	18
2.9.3 Semi-quantitativ	19
2.9.4 Pixelanalytisch	20
3. Publikation	22
Feasibility of transabdominal Doppler ultrasonography for studying ovarian blood flow characteristics in cycling gilts	

Inhaltsverzeichnis

4. Diskussion	46
5. Zusammenfassung	53
6. Summary	55
7. Literaturverzeichnis	

Anhang

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche
A., Aa.	Arteria, Arteriae
Abb.	Abbildung
Amix	perfundierte Fläche unabhängig von der Blutflussrichtung
A-Mode	Amplituden-Mode
Ang II	Angiotensin II
avi	Audio Video Interleave
BFG	Blutflussgeschwindigkeit
BFV	Blutflussvolumen
B-Mode	Brightness Mode
c	Schallgeschwindigkeit im Weichteilgewebe
CH	Corpus haemorrhagicum
CL	Corpus luteum
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
D	Diöstrus
dB	Dezibel
D _{BFG}	enddiastolische Blutflussgeschwindigkeit
DLG	Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft
E	Östrus
eCG	Equine chorionic Gonadotropin
e.g.	exempli gratia, zum Beispiel
ET-1	Endothelin-1
Fa.	Firma
F _d	Dopplershifffrequenz
F _r	reflektierte Frequenz

Abkürzungsverzeichnis

FSH	Follikelstimulierendes Hormon
F ₀	Ausgangsfrequenz
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
h	Stunde
hCG	humanes Choriongonadotropin
I	Intensität
i.e.	id est, das heißt
i.m.	intramuskulär
Imix	Blutflussintensität unabhängig von der Blutflussrichtung
IVF	In vitro fertilization
JPG	Joint Photographic Experts Group
kg	Kilogramm
LH	Luteinisierendes Hormon
M	Metöstrus
MHz	Megahertz
mm	Millimeter
No.	Number
NO	Stickoxid
Nr.	Nummer
P	Proöstrus
p-Wert	Signifikanzwert
PI	Pulsatilitätsindex
Plvmix	Pulsatilitätsindex bezüglich der Blutflussgeschwindigkeit, unabhängig von der Blutflussrichtung
p.i.	post inseminationem
PRF	Pulsrepetitionenfrequenz
PW	Pulsed-wave
r	Korrelationskoeffizient

Abkürzungsverzeichnis

RI	Resistenzindex
RI _{vmix}	Resistenzindex bezüglich der Blutflussgeschwindigkeit, unabhängig von der Blutflussrichtung
ROI	Region of interest
s	Sekunde
S _{BFG}	systolische Blutflussgeschwindigkeit
SEM	standard error of the mean, Standardfehler
Tab.	Tabelle
TVV	Tierversuchsvorhaben
USB	Universal serial bus
V., Vv.	Vena, Venae
v	Strömungsgeschwindigkeit
v _m	maximale Blutflussgeschwindigkeit aus mehreren Herzzyklen
vmix	Blutflussgeschwindigkeit unabhängig von der Blutflussrichtung
\bar{X}	Mittelwert
°	Grad

1 Einleitung

Die transabdominale B-Mode Sonographie wird in der Schweinereproduktion bereits seit über 30 Jahren eingesetzt (INABA et al. 1983). Ursprünglich verwendete man diese Methode zur frühzeitigen Trächtigkeitsdiagnostik (INABA et al. 1983; IRIE et al. 1984). Später erweiterte sich das Nutzungsspektrum um die Darstellung des gesamten auch ingraviden Reproduktionstraktes des Schweins. So war es dann möglich, ovarielle und uterine pathologische Strukturen (BOTERO et al. 1986) darzustellen. Hinzu kam, dass nunmehr Ovulationszeitpunkte zu bestimmen (WEITZE 1989) und der Pubertätsstatus von Jungsauen (KAUFFOLD et al. 2004) ultrasonographisch zu erfassen waren.

Durch die Einführung der Doppler-Sonographie in der Veterinärmedizin konnten in den darauffolgenden Jahren uterine und ovarielle Strukturen diverser Tierspezies noch eingehender untersucht werden. So ermittelten BOLLWEIN et al. (1998) den Blutflusswiderstand in der *Arteria (A.) uterina* zyklischer Stuten mittels farbkodierter Doppler-Sonographie. Nachfolgend wurde der Blutfluss der *A. ovarica* von Stuten (BOLLWEIN et al. 2002) und Hündinnen (KÖSTER et al. 2001) an ausgewählten Zeitpunkten im Sexualzyklus dopplersonographisch erfasst. Die Doppler-Sonographie erwies sich ebenfalls als geeignet, um die Perfusion von ovariellen Funktionsgebilden wie Follikelwänden (ACOSTA et al. 2004; RAUCH 2008) und *Corpora lutea* (CL) (UTT 2009; HERZOG et al. 2010) zu beurteilen. Dies ermöglichte eine präzisere Beurteilung der Gelbkörperaktivität, als es bisher allein anhand dessen Größenbestimmung möglich war (HERZOG et al. 2010). Weiterhin konnten Zysten bezüglich ihrer Genese mittels Doppler-Sonographie genauer klassifiziert werden (RAUCH 2008).

Untersuchungen zur Perfusion des Genitaltraktes beim Schwein sind relativ spärlich. Früher wurden invasive Untersuchungsverfahren genutzt. So gelang es RATHMACHER und ANDERSON (1968) als auch FORD et al. (1982), das luteale Blutflussvolumen (BFV) von Sauen an ausgewählten Tagen des Diöstrus mithilfe applizierter radioaktiver Substanzen bzw. Mikrosphären zu ermitteln. MAGNESS et al. (1983) verwendeten invasiv platzierte elektromagnetische Blutflusssonden, um die ovarielle Perfusion im Verlauf eines gesamten Zyklus und in der Frühgravidität zu untersuchen. Dabei konnte u.a. gezeigt werden, dass das ovarielle BFV

zyklusabhängig im Diöstrus am höchsten und im Östrus am niedrigsten ist (MAGNESS et al. 1983).

Erste dopplersonographische Untersuchungen der weiblichen Geschlechtsorgane des Schweins dienten der Erfassung der Herzfrequenz von Feten im peripartalen Zeitraum (COHEN et al. 1997; JONKER 2004). BRÜSSOW et al. (2012) nutzten laparoskopisch geführte Doppler-Sonden, um Blutflusscharakteristika der Nabelarterien von Feten unterschiedlichen Alters zu studieren. In der unlängst erschienenen Arbeit von HERLT et al. (2019) wurde transabdominal dopplersonographisch untersucht, um Perfusionsverhältnisse des Uterus bei der Jungsau zu charakterisieren. Mittels farbkodierter Doppler wurde bestätigt, dass die uterine Durchblutung einer zyklusabhängigen Dynamik folgt. Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Studien an Stuten (BLAICH 1999), Kühen (BOLLWEIN et al. 1997) und Hündinnen (FREEMAN et al. 2013).

Dopplersonographische Untersuchungen zur Charakterisierung der Durchblutung des Ovars beim Schwein fehlen. Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, die Anwendbarkeit der transabdominalen farbkodierten Doppler-Sonographie zur Untersuchung der ovariellen Perfusion von Jungsauen zu überprüfen und die Perfusion im Verlauf eines Sexualzyklus zu charakterisieren.

2 Literaturübersicht

2.1 Der Sexualzyklus des Schweins

Die Jungsau erreicht die Geschlechtsreife, in Abhängigkeit von der Genetik, mit 150-220 Tagen und hat einen Sexualzyklus mit einer durchschnittlichen Länge von 18-24 Tagen (SOEDE et al. 2011). Dieser wird in die Abschnitte Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus unterteilt (SCHNURRBUSCH und HÜHN 1994). Der Zyklus unterliegt einer hormonellen Regulation durch das hypothalamische Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH), das aus der Adenohypophyse ausgeschüttete Follikelstimulierende Hormon (FSH) und das Luteinisierende Hormon (LH), als auch durch die von den Ovarien sezernierten Hormone Östradiol-17 β , Inhibin und Progesteron (SOEDE et al. 2011). Die hormonell bedingten, zyklusabhängigen morphologischen Veränderungen an den Ovarien lassen sich in den einzelnen Zyklusabschnitten mittels B-Mode Sonographie darstellen (SOEDE et al. 1992; KAUFFOLD et al. 2004). *Post ovulationem* sind die Ovarien von diffuser Echogenität (KAUFFOLD et al. 1997). Die Konzentrationen von Inhibin und 17 β -Östradiol, von ehemals Graaf'schen Follikeln gebildet, sinken (SOEDE et al. 2011). Dadurch entfällt das negative Feedback auf die FSH Freisetzung, welches nun vermehrt ausgeschüttet wird. Unter FSH Einfluss reifen bereits unmittelbar *post ovulationem* kleine und mittelgroße Follikel heran (KNOX 2005; SOEDE et al. 2011). Diese sind sonographisch als runde, anechogene Gebilde darstellbar (KNOX und ALTHOUSE 1997). Im Metöstrus (3.-6. Zyklustag, SCHNURRBUSCH und HÜHN 1994) lassen sich *post ovulationem Corpora hämorrhagica* (CH) als inhomogene, hypoechogene, unregelmäßig konturierte Gebilde darstellen (KNOX und ALTHOUSE 1997). Diese haben sich durch Einblutung in die ehemalige Follikelhöhle gebildet. CH entwickeln sich bis Tag 6 des Sexualzyklus zu traubenartig angeordneten, hyperechogeneren, Progesteron produzierenden CL (KNOX und ALTHOUSE 1997; SOEDE et al. 2011), die im Diöstrus (7.-17. Tag, SCHNURRBUSCH und HÜHN 1994) eine durchschnittliche Größe von 10-12 mm erreichen können (KNOX und ALTHOUSE 1997). Progesteron wirkt hemmend auf die GnRH- und nachgeordnet Gonadotropin-Freisetzung, wodurch in der frühen lutealen Phase nur kleine und mittelgroße Follikel vorhanden sind (KNOX 2005). Ab Tag 12 sezerniert das Endometrium des Schweins Prostaglandin 2 α (PGF 2 α) (SCHNURRBUSCH und HÜHN 1994), welches zur Luteolyse der CL und somit zum Abfall der Progesteronkonzentration führt (SOEDE

et al. 2011). Durch das Absinken des Progesteronspiegels entfällt die hemmende Wirkung auf die GnRH- und nachfolgend Gonadotropin-Freisetzung (SOEDE et al. 2011). Infolgedessen induzieren diese Hormone erneutes Follikelwachstum. FSH führt zu einer Zunahme der Follikelanzahl und deren Heranreifung zu mittel bis großen Follikeln (Rekrutierung). Die rekrutierten Follikel atresieren oder werden durch die Wirkung von LH ausgewählt (Selektion) und reifen nachfolgend zu präovulatorischen Follikeln heran (KNOX 2005). Dementsprechend erfolgt die Selektion der zur Ovulation bestimmten Follikel durch einen „Hormonshift“ von FSH zu LH (KNOX 2005). Dieser besagt, dass die Anzahl FSH-Rezeptoren kleiner und mittelgroßer Follikel am Ende des Diöstrus und zu Beginn des Proöstrus (18 - 21. Zyklustag, SCHNURRBUSCH und HÜHN 1994) abnehmen. LH-Rezeptoren werden dann vermehrt exprimiert. Diejenigen Follikel, die am Effizientesten diesen „Schiff“ bewerkstelligen, sind privilegiert und reifen zu präovulatorischer Größe heran. Alle anderen atresieren (LUCY et al. 2001). *Ante ovulationem* (ca. 12-24 h vor der Ovulation) ändert sich die Form der designierten, präovulatorischen Follikel von rund zu oval und später polygonal (KAUFFOLD und ALTHOUSE 2007). Diese können zu Beginn des Östrus (1.-2. Zyklustag, SCHNURRBUSCH und HÜHN 1994) eine Größe von 7-10 mm erreichen (KNOX und ALTHOUSE 1997; KAUFFOLD et al. 1997). Durch follikuläre Östrogene induziert steigt die Konzentration des LH, um unmittelbar *ante ovulationem* im sogenannten präovulatorischen LH-Peak zu münden. Ca. 30 h später tritt die Ovulation auf (SOEDE et al. 2011). Diese beginnt im letzten Drittel des Östrus und wird sonographisch durch das Auftreten von CH sowie einer kontinuierlichen Abnahme der zuvor dokumentierten Follikelanzahl sichtbar (SOEDE et al. 1992; KNOX und ALTHOUSE 1997).

2.2 Blutversorgung der Ovarien des Schweins

Die ovarielle Blutversorgung erfolgt über die miteinander anastomosierenden Gefäße *Arteriae (Aa.) ovarica, uterina und vaginalis*. (Abb. 0).

2.2.1 Arteria (A) und Vena (V.) ovarica

Die *A. ovarica* entspringt beidseitig aus der Aorta auf Höhe des vierten Lendenwirbels (LANGE 1979). Nach Abgabe eines Astes an die Ureteren teilt sich das Gefäß jeweils in drei Hauptzweige (LANGE 1979). Diese bilden einen Plexus

dorsal und ventral des jeweiligen Ovars und versorgen die Ovarien, Mesosalpingen und Eileiter (OXENREIDER et al. 1965) und bilden zusätzlich Anastomosen mit einem *R. uterinus* der *A. uterina* (LANGE 1979).

Die *V. ovarica* verläuft parallel zu der kleineren *V. uterina* im Mesometrium und bildet zahlreiche Anastomosen mit dieser. Im weiteren Verlauf zieht die *V. ovarica* beidseitig parallel zu der *A. ovarica* und erhält venöses Blut von dem ipsilateralen Ovar, Mesosalphinx, Ureter und dem Uterus vor Einmündung in die *V. cava caudalis* (OXENREIDER et al. 1965).

2.2.2 *A. und V. uterina*

Die *A. uterina*, das Hauptversorgungsgefäß des Uterus, entspringt aus der *A. umbilicalis*, die aus der *A. iliaca interna* hervorgeht (LANGE 1979). Die *A. uterina* teilt sich in zwei bis drei Hauptäste, die sich nachfolgend weiter aufspalten (OXENREIDER et al. 1965). Äste der *A. uterina* bilden Anastomosen mit dem zuvor beschriebenen ovariellen Plexus und den Mesosalpingen (OXENREIDER et al. 1965), verlaufen beidseitig entlang des *Ligamentum latum uteri* und entlassen im Verlauf kleinere Zweige, welche die uterinen Hörner umschließen (BOYE 1956). Diese Abzweigungen treten in Form von *Aa. arcuatae* in das Myometrium ein und formen einen arteriellen Plexus. Ausgehend von diesem ziehen *Arteriola*e ins Endometrium (OXENREIDER et al. 1965). Das venöse Gegenstück, die *V. uterina*, teilt sich in zwei Äste, wovon der eine Ast, wie bereits beschrieben, Anastomosen mit der *V. ovarica* bildet und der andere parallel zu der *A. uterina* bis zur Mündung in die *V. ureterica* verläuft (OXENREIDER et al. 1965).

2.2.3 *A. und V. vaginalis*

An der Blutversorgung des Uterus und somit der Ovarien ist ein weiterer Ast der *A. iliaca interna*, die *A. vaginalis*, beteiligt (LANGE 1979). Diese entlässt kurz nach ihrem Ursprung aus der *A. iliaca interna* einen *R. uterinus*. Dieser Ast entlässt Zweige, welche die Zervix versorgen. Anschließend tritt der Ast ventral in den Uterus ein und bildet Anastomosen mit Ästen der *A. uterina* (OXENREIDER et al. 1965). Die *V. vaginalis* verläuft parallel zur gleichnamigen Arterie und mündet in die *V. iliaca interna* (OXENREIDER et al. 1965).

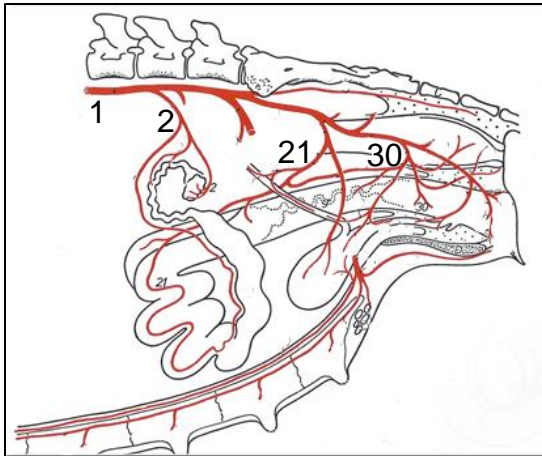


Abb. 0: Die Arterien des porcinen Genitaltraktes: Aorta (1), *A. ovarica* (2), *A. uterina* (21) und *A. vaginalis* (30) (modifiziert nach NICKEL et al. 1996).

2.3 Grundlagen der B-Mode Sonographie

Als Grundlage der heutigen Ultraschallsysteme gilt die Entdeckung des piezoelektrischen Effekts der Brüder Curie 1880 (SCHÄBERLE 2010). Erfolgt Druck auf einen Ionenkristall (Piezokristall), verformt sich dieser elastisch. Daraus resultieren Ladungsverschiebungen im Inneren des Kristalls, aus denen elektrische Spannungen an dessen Oberfläche entstehen (SCHÄBERLE 2010). Umgekehrt verändert ein piezoelektrischer Kristall seine Länge, wenn eine elektrische Spannung angelegt wird (SCHÄBERLE 2010). Durch Anwendung von Wechselspannung wird der Kristall in Schwingung versetzt (SCHÄBERLE 2010). Als Folge der beschriebenen Umkehrbarkeit des piezoelektrischen Effekts können Piezokristalle als Sender und Empfänger agieren. Piezokristalle sind kardinaler Bestandteil von Ultraschallsonden. Werden sie einer elektrischen Spannung ausgesetzt, wird diese in Ultraschallimpulse umgewandelt, die als Schallwellen mit einer bestimmten Frequenz ausgesandt werden (SCHÄBERLE 2010). Diese Wellen treffen auf Grenzflächen, die zwischen Medien mit unterschiedlichem Schallwiderstand (akustische Impedanz) entstehen (SCHÄBERLE 2010). Die Höhe der akustischen Impedanz ist abhängig von der Dichte eines Mediums und dessen Schallausbreitungsgeschwindigkeit (SCHÄBERLE 2010). Je nachdem, wie Schallwellen auf Grenzflächen treffen (das heißt, in welchem Winkel), werden sie reflektiert, gestreut, gebrochen und absorbiert (SCHÄBERLE 2010). Deshalb ist ein Ultraschallbild immer eine Kombination dieser Schallwellencharakteristika (SCHÄBERLE 2010). Zu Beginn der Ultraschalldiagnostik

wurden diese Echos als Amplituden eindimensional abgebildet (Amplitudenmode; A-Mode), wobei die Position der Amplitude die Tiefe der Grenzfläche und der Amplitudenausschlag die Echostärke codierte. Heutzutage wendet man standardmäßig den bildgebenden Ultraschall, d.h. den Brightness Mode (B-Mode), an. Bei dieser Methode werden die Amplituden als Lichtpunkte abgebildet. Deren Helligkeit entspricht der Intensität des Echos (SCHÄBERLE 2010). Daraus ergibt sich eine zweidimensionale Darstellung aus einer Vielzahl von Pixeln.

2.4 B-Mode Sonographie des porzinen Reproduktionstraktes

Die B-Mode Sonographie des porzinen Reproduktionstraktes wurde erstmalig zur frühzeitigen Trächtigkeitsdiagnostik angewandt (INABA et al. 1983; IRIE et al. 1984). Dabei wurde transkutan (transabdominal) am stehenden Tier untersucht, indem die Ultraschallsonde an der seitlichen Bauchwand, hinter dem Nabel, seitlich der Zitzen auf den Uterus zu richten war (INABA et al. 1983). Ab dem 22.Tag *post inseminationem* (p.i.) war die Trächtigkeitsdiagnostik zu 100% korrekt (INABA et al. 1983). In den darauffolgenden Jahren fand diese Methode zunehmend Anwendung (KNOX und ALTHOUSE 1999; DeRESNIS et al. 2000). KNOX und ALTHOUSE (1999) konnten bereits am 16. Tag p.i. trächtigkeitsspezifische Strukturen nachweisen, obgleich die Genauigkeit einer transabdominal detektierten Gravidität erst ab Tag 18 p.i. bei über 90 % lag (DeRESNIS et al. 2000).

Darüber hinaus wurden porzine Trächtigkeitsuntersuchungen mittels transrektaler Sonographie durchgeführt (FRAUNHOLZ et al. 1989; KNOX und ALTHOUSE 1997; KAUFFOLD und ALTHOUSE 2007). Die Anwendung einer Schiene als Halterung und Einführhilfe für die Ultraschallsonde während der Untersuchung am ebenfalls stehenden Tier erwies sich dabei als praktikabel (KNOX und ALTHOUSE 1997). Anhand von transrektal darstellbaren Gelbkörpern und flüssigkeitsgefüllten Uterushorn Anschnitten war eine indirekte Trächtigkeitsdiagnostik bereits am 16. Tag p.i. möglich (KNOX und ALTHOUSE 1997). Ab 18. Tag p.i. gelang die Darstellung eines Embryos mittels transrektaler Sonographie (MILLER et al. 2003). Weiterhin konnte der fetale Herzschlag sonographisch erstmalig zwischen dem 21. (FRAUNHOLZ et al. 1989) und 25. Tag p.i. (CARTEE et al. 1985) detektiert werden.

Im Folgenden verglichen MILLER et al. (2003) die Genauigkeit der beiden zuvor genannten Methoden zur frühzeitigen Trächtigkeitsdiagnostik. Bis zum 22. Tag p.i.

war die transrektale Sonographie der transabdominalen überlegen. Ab dem 24. Tag p.i. waren die Ergebnisse beider Methoden allerdings annähernd identisch (MILLER et al. 2003).

In den Folgejahren wurde das diagnostische Potenzial der transabdominalen und transrektalen Sonographie in der Gynäkologie des Schweins weiter entwickelt und beide Untersuchungsmethoden wurden je nach persönlicher Präferenz der Autoren angewandt. Die transabdominale als auch die transrektale Sonographie erwiesen sich als geeignet, ovarielle Funktionskörper zyklusabhängig darzustellen (RYAN et al. 1994; MORIYOSHI et al. 1996; KAUFFOLD et al. 2006; DA SILVA et al. 2017) und den nichtgraviden Uterus anhand spezifischer Echotexturmuster zu charakterisieren (KAUFFOLD et al. 2005, 2010; VON DEM BUSSCHE-HÜNNEFELD 2007). KAUFFOLD et al. konnten anhand transabdominaler sonographischer Untersuchungen der uterinen Echotextur, Größe und des Inhaltes (2005, 2010) als auch der Ovarien (2004) die Ursachen von Fertilitätsstörungen aufzeigen.

Die B-Mode Sonographie fand weiterhin Anwendung zur Bestimmung des Ovulationszeitpunktes (WEITZE 1989; SOEDE et al. 1992, 1994, 1995; KEMP und SOEDE 1996; NISSEN et al. 1997; BOLARIN et al. 2006; VORHAGEN 2015) und der Ovulationsdauer (SOEDE et al. 1992, 1994, 1995; KEMP und SOEDE 1996). In den Studien von SOEDE et al. (1992, 1994, 1995) und KEMP und SOEDE (1996) wurden die Ovarien nach Östrusbeginn in regelmäßigen Abständen sonographisch transrektal untersucht. Initial wurde die Anzahl präovulatorischer Follikel ($\geq 4\text{mm}$) dokumentiert. Die Abnahme der Follikelanzahl wurde als Ovulationsbeginn gewertet. Eine Ovulation galt als abgeschlossen, wenn in aufeinanderfolgenden sonographischen Untersuchungen eine konstant kleine Anzahl präovulatorischer Follikel oder keine Follikel mehr sichtbar waren (SOEDE et al. 1992, 1994, 1995; KEMP und SOEDE 1996). In der Studie von NISSEN et al. (1997) konnte gezeigt werden, dass eine Besamung 28 Stunden vor bis 4 Stunden *post ovulationem* am erfolgreichsten ist. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von BOLARIN et al. (2006), die ebenfalls feststellten, dass periovulatorische Besamungen von Schweinen zu höheren Trächtigkeitsraten führten. Im Gegensatz dazu untersuchte VORHAGEN (2015) die Größe und Form präovulatorischer Follikel 30 h prä ovulationem bis zur Ovulation mittels transabdominaler Sonographie. Dabei zeigte sich, dass die Follikelgröße lediglich bis 12 h vor dem Ovulationszeitpunkt zunimmt.

Ferner konnte eine Formveränderung der sprungreifen Follikel von rund zu polygonal beobachtet werden (VORHAGEN 2015).

Die transabdominale Sonographie wurde weiterhin eingesetzt, um Pathologien des Reproduktionstraktes wie Metritiden (BOTERO et al. 1986; KAUFFOLD et al. 1997; KAUFFOLD und ALTHOUSE 2007) und Ovarialzysten (BOTERO et al. 1986; KNOX und ALTHOUSE 1999; CECH und DOLEZEL 2007) zu detektieren. Ferner gelang es, die transabdominale B-Mode Sonographie zur Bestimmung des Pubertätsstatus von Jungsauen zu instrumentalisieren (MARTINAT- BOTTÉ et al. 2003; KAUFFOLD et al. 2004; MARTINAT- BOTTÉ et al. 2011). MARTINAT- BOTTÉ et al. (2003) konnten anhand der Zunahme von uteriner Fläche und Echogenität präpubertale von pubertalen Jungsauen unterscheiden. In der Studie von KAUFFOLD et al. (2004) erfolgte neben der Beurteilung uteriner Charakteristika zusätzlich eine Beurteilung der Ovarien zur Feststellung des Pubertätsstatus. Ein Tier wurde als präpubertal klassifiziert, wenn ausschließlich Follikel von 2-5 mm Durchmesser existierten. Die geschlechtsreifen Jungsauen hingegen wurden aufgrund einer Follikelgröße von 7-8 mm und dem Vorhandensein von CL oder CH erkannt.

Aufgrund des breiten Anwendungsspektrums entwickelte sich die B-Mode Sonographie zu einem wertvollen Instrument im Rahmen der Abklärung bestandsspezifischer Fruchtbarkeitsprobleme (MARTINEZ et al. 1992; KAUFFOLD et al. 2000, 2004, 2005; KNOX und PROBST-MILLER 2004; CECH und DOLEZEL 2007).

2.5 Grundlagen der Doppler-Sonographie

Die Doppler-Sonographie beruht auf dem von Christian Doppler 1842 benannten Effekt (DOPPLER 1843; SCHÄBERLE 2010), demzufolge es zu einer Frequenzverschiebung kommt, wenn sich die Distanz zwischen Beobachter und Schallquelle verändert (SCHÄBERLE 2010). Eine Frequenzerhöhung im Vergleich zur ausgesendeten Frequenz tritt auf, wenn die Schallquelle sich auf den Beobachter zu bewegt, eine Frequenzerniedrigung, wenn sich diese vom Beobachter entfernt (SCHÄBERLE 2010). Die Differenz zwischen der gesendeten und empfangenen Frequenz nennt man Dopplerschiffrequenz (SCHÄBERLE 2010). In der Humanmedizin beschrieben SATUMORA und KANEKO (1960) erstmals die

Anwendung des Dopplereffekts zur Messung von Blutflussgeschwindigkeiten (BFG). Dabei ist die Ultraschallsonde statischer Sender und Empfänger von Ultraschallwellen (SCHÄBERLE 2010). Die Ultraschallwellen treffen auf sich bewegendes Teilchen (Erythrozyten) und werden abhängig von deren Strömungsrichtung- und Geschwindigkeit mit einer veränderten Frequenz reflektiert (SCHÄBERLE 2010). Die Blutflussgeschwindigkeit in einem Gefäß ist nicht einheitlich und folgt dem Prinzip der laminaren Strömung, d.h., dass die Erythrozyten im Randbereich langsamer strömen als im Zentrum des Gefäßes. Deshalb wird keine einzelne Frequenzverschiebung sondern ein Frequenzgemisch gemessen (SCHÄBERLE 2010). Daneben haben der Winkel (Dopplerwinkel) zwischen der Gefäßachse und dem Schallstrahl und die ursprünglich genutzte Frequenz einen Einfluss auf die Dopplershiftfrequenz (SCHÄBERLE 2010), die wie folgt berechnet wird:

$$F_d = F_0 - F_r = 2F_0 \cdot v \cdot \cos\alpha / c$$

F_d Dopplershiftfrequenz,

F_0 Ausgangsfrequenz,

F_r reflektierte Frequenz,

v mittlere Strömungsgeschwindigkeit der reflektierenden Blutkörperchen

c Schallgeschwindigkeit im Weichteilgewebe (ca. 1540 m/s)

α Winkel zwischen Schallstrahl und Strömungsrichtung

(nach SCHÄBERLE 2010)

Anhand der Dopplershiftfrequenz lässt sich die Strömungsgeschwindigkeit v berechnen:

$$v = (F_d - F_0) \cdot c / \cos\alpha \cdot 2F_0$$

(nach SCHÄBERLE 2010)

Wird ein zu großer Dopplerwinkel gewählt, treten Messfehler auf (SCHÄBERLE 2010). Bei einem Winkel von 90° ist keine Dopplershiftfrequenz und folglich keine Blutflussgeschwindigkeit messbar, da sich trotz vorhandenen Flusses keine Bewegung zwischen Schallsonde und Erythrozyten detektieren lässt (SCHÄBERLE 2010). Optimal ist ein spitzer Winkel von unter 60° (SCHÄBERLE 2010). Heutzutage eingesetzte Ultraschallgeräte bieten die Möglichkeit einer Winkelkorrektur, indem der

Winkel zwischen dem Ultraschallstrahl und der Gefäßachse bestimmt und mittels $1/\cos\alpha$ korrigiert wird (SCHÄBERLE 2010).

2.6 Doppler-Methoden

2.6.1 Continuous-wave Doppler-Sonographie (CW-Doppler)

Bei dieser Art der Doppler-Sonographie fungiert ein piezoelektrischer Kristall als Sender und ein weiterer Kristall als Empfänger von Ultraschallimpulsen. Durch das kontinuierliche Senden und Empfangen von Impulsen ist es nicht möglich, die Laufzeit zwischen den emittierten und empfangenen Signalen zu berechnen. Deshalb kann keine Untersuchungstiefe bestimmt werden (SCHÄBERLE 2010). Signale aus sich überschneidenden Gefäßen können sich überlagern (SCHÄBERLE 2010; HAUER 2011). Diese Technik ist deshalb nur zur Darstellung oberflächlicher Gefäße geeignet (HAUER 2011).

2.6.2 Pulsed-wave Doppler-Sonographie (PW-Doppler)

Dieses Verfahren bildet in Kombination mit der B-Mode Sonographie die Grundlage der Duplexsonographie. Bei der Pulsed-wave Doppler-Sonographie fungiert nur ein piezoelektrischer Kristall als Sender und Empfänger (SCHÄBERLE 2010). Dieser schaltet sich nach dem Aussenden von einem Impuls ab. Eintreffende Echos werden in diesem Zeitraum nicht berücksichtigt. Nach definierter Zeit schaltet der Kristall auf „Empfangen“. Echos aus einem zuvor definierten Bereich („sample volume“) werden konvertiert (SCHÄBERLE 2010). „Die Anzahl der pro Sekunde ausgesendeten Ultraschallpulse wird als Pulswiederholfrequenz oder Pulsrepetitionsfrequenz (PRF) bezeichnet.“ (SCHÄBERLE 2010). Die PRF ist das Reziproke des Pulsabstandes und verlängert sich mit zunehmender Eindringtiefe (SCHÄBERLE 2010). Somit ist die Zeit bis ein erneuter Ultraschallimpuls ausgesendet werden kann abhängig von der Eindringtiefe (SCHÄBERLE 2010). Das Zeitfenster zwischen Empfangen und erneutem Senden von Signalen, die Pulslaufzeit, limitiert die Erfassung höherer Blutflussgeschwindigkeiten (SCHÄBERLE 2010). Dabei gilt Folgendes: „Die maximal richtig messbare Frequenz ist kleiner als die halbe Pulsrepetitionsfrequenz. Die Pulsrepetitionsfrequenz muss folglich mindestens doppelt so hoch sein wie die zu messende Dopplerfrequenz.“ (SCHÄBERLE 2010). Liegt die Dopplerfrequenz oberhalb der Hälfte der PRF, kommt es zu einer fehlerhaften Darstellung der Strömungsrichtung- und Geschwindigkeit. Dieses Phänomen ist ein Artefakt und wird als Aliasing bezeichnet. Farbdoppler sonographisch stellt sich dieses Phänomen als Farbumschlag in die Gegenfarbe dar, kann aber aufgrund der Farbhelligkeit von einer tatsächlichen Strömungsumkehr unterschieden werden (SCHÄBERLE 2010). Das Auftreten von Aliasing kann verhindert werden, indem man die PRF erhöht (SCHÄBERLE 2010).

2.6.3 Farbkodierte Doppler-Sonographie

Die farbkodierte Doppler-Sonographie stellt die Kombination aus einem zweidimensionalen B-Mode Bild mit einer farbigen Darstellung von Strömungsinformationen dar und wird daher auch als Farbduplexsonographie bezeichnet (SCHÄBERLE 2010). Die abgebildeten Farbsignale sind abhängig von der Richtung der sich bewegenden korpuskulären Blutbestandteile und deren Geschwindigkeit. Blutströmungen, die auf den Schallkopf zufließen, werden rot,

wegfließende blau dargestellt. Die Helligkeit der jeweiligen Farbsignale codiert die Blutflussgeschwindigkeit (ACOSTA et al. 2003). Je heller die Farbsignale, desto höher ist die Blutflussgeschwindigkeit. Dunkle Farbsignale sind ein Zeichen niedriger Blutflussgeschwindigkeiten (SCHÄBERLE 2010).

2.6.4 Power Doppler-Sonographie

Im Power Doppler Modus „(...) wird die Summe der Dopplersignalintensitäten der sich bewegenden Teilchen in Farbhelligkeit ausgedrückt“ (SCHÄBERLE 2010). Diese ist abhängig von der Dichte der fließenden Teilchen. Je höher diese ist, desto heller der Bildpunkt (SCHÄBERLE 2010). Die Strömungsgeschwindigkeit und Richtung werden nicht ermittelt (SCHÄBERLE 2010). Die Power Doppler-Sonographie ist im Vergleich zur farbkodierten Doppler-Sonographie sensibler gegenüber Teilchen mit niedriger Strömungsgeschwindigkeit und kann Blutflüsse in kleineren Gefäßen mit geringerer Anzahl reflektierender Erythrozyten besser detektieren (SCHÄBERLE 2010). Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Doppler Methoden ist Power Doppler winkelunabhängig. Aufgrund intensitätsbasierter Darstellung und nicht Berücksichtigung der Frequenzverschiebung tritt kein Aliasing auf (SCHÄBERLE 2010).

2.7 Dopplersonographische Untersuchungen der ovarielle Perfusion in der Veterinärmedizin

In der Veterinärmedizin wurde die Doppler-Sonographie bereits vor über 40 Jahren im Rahmen invasiver ovarieller Perfusionsstudien angewandt. Dabei eigneten sich vor allem Schafe für die invasiven Blutflussmessungen, da sie über gut zugängliche Gefäßstrukturen sowie ein großes Blutflussvolumen verfügen, welches eine frequentierte Beprobung zur zeitgleichen Bestimmung der Konzentrationen reproduktionsrelevanter Hormonkonzentrationen ermöglicht (NISWENDER et al. 1976). NISWENDER et al. (1975) und BROWN et al. (1980) implantierten Blutflusssonden an Ovararterien von Schafen. Es konnte demonstriert werden, dass sich die Perfusion der Ovarien zyklusabhängig ändert. In der lutealen Phase waren die Blutflussvolumina und Blutflussgeschwindigkeiten am höchsten, unmittelbar *ante ovulationem* am niedrigsten.

In den darauffolgenden Jahren fanden vor allem nicht-invasive Untersuchungsmethoden Anwendung, um die ovarielle Durchblutung zu studieren.

Stuten wurden transrektal untersucht, um Blutflusscharakteristika der A. ovarica mittels PW- und Farbdoppler (BÜHLMAYER 1999; BOLLWEIN et al. 2002; ROHR 2003; BOLLWEIN et al. 2004) zu erfassen. Später gelang auch die Darstellung kleinerer intraovarieller Gefäße, deren Perfusion sich zyklusabhängig änderte (BOLLWEIN et al. 2002; GINTHER et al. 2007; ACOSTA et al. 2004). Sie war, ähnlich wie bei Schafen, im Diöstrus hoch (ROHR 2003). Auch die bovinen Reproduktionsmedizin profitierte von dopplersonographischen Verfahren, mit deren Hilfe Perfusionsprofile von Corpora lutea (ACOSTA et al. 2003; UTT et al. 2009; HERZOG et al. 2010; LANSBERGEN 2013), präovulatorischen Follikeln (ACOSTA et al. 2003) und Zysten unterschiedlicher Pathogenese (RAUCH et al. 2008) erstellt werden konnten. Dasselbe trifft für Hündinnen zu, bei denen gleichfalls eine Zyklusabhängigkeit der ovariellen Perfusion zu beobachten war (KÖSTER et al. 2001; BERGERON et al. 2013). Interessant und konträr zu oben beschriebenen landwirtschaftlichen Nutztieren nahm die Durchblutung bei Hündinnen im Östrus zu (BERGERON et al. 2013). Diese Beobachtung erwies sich als hilfreich im Rahmen der Bestimmung des Ovulationszeitpunktes.

2.8 Untersuchungen der ovariellen Perfusion von Schweinen

Beim Schwein fanden bisher nur invasive Verfahren zur Messung der ovariellen Perfusion Anwendung. In der Studie von RATHMACHER und ANDERSON (1968) wurde untersucht, wie sich die uterine und ovarielle, insbesondere luteale, Perfusion in graviden und graviden Schweine zu ausgewählten Zeitpunkten des Zyklus bzw. der Trächtigkeit verhielt. Dabei fand eine radioaktive Substanz, Rubidiumchlorid ($^{86}\text{RbCl}$), Anwendung. Diese wurde in die Femoralvene anästhesierter Tiere appliziert, um anhand des Produktes aus akkumulierter Radioaktivität des jeweiligen Ovars und Herzzeitvolumen auf den Blutfluss zurückzuschließen. Ergebnisse dieser Studie waren unter anderem, dass sich der luteale Blutfluss tragender und nicht tragender Tiere zwischen den Tagen 10 und 16 p.i. glich und die Abnahme des lutealen Blutflusses nicht vor der lutealen Regression (strukturell durch eine Gewichtsabnahme und funktionell durch Bestimmung der Progesteronkonzentration nachgewiesen) beginnt. Ähnlich gingen FORD et al. (1982) vor. In deren Studie fanden ebenfalls radioaktive Substanzen Verwendung, die als markierte Mikrosphären nicht besamten und besamten Jungsauen über Katheter im linken Ventrikel des Herzens und der linken Femoralarterie an den Zyklustagen 9, 11, 13

und 15 appliziert wurden. Uterus- und Ovargewebe wurden daraufhin auf radioaktive Mikrosphären untersucht und anhand der Anzahl gefundener Mikrosphären auf die Durchblutung geschlossen. Sowohl besamte als auch nicht besamte Jungsauen wiesen am Tag 13 die höchste luteale Perfusion auf. MAGNESS et al. (1983) hingegen platzierten eine elektromagnetische Blutflusssonde entlang einer zufällig ausgewählten Ovararterie tragender und nicht-tragender Sauen, um das ovarielle Blutflussvolumen täglich während des Brunstzyklus und den ersten 21 Tagen p.i. zu untersuchen. Der ovarielle Blutfluss zeigte ähnlich wie bei zuvor genannten Tierarten, d.h. Hündinnen (KÖSTER et al. 2001), Stuten (GINTHER et al. 2007) und Kühen (HERZOG et al. 2010), zyklusabhängige Veränderungen. Er war bei nicht-tragenden Tieren im Östrus am niedrigsten und im Diöstrus am höchsten.

2.9 Methoden zur Analyse dopplersonographisch erzeugter Daten

Dopplersonographisch erzeugte Blutflussdaten können qualitativ, quantitativ, semi-quantitativ und pixelanalytisch (WÜNSCHMANN 2007), als Form der semi-quantitativen Methode, ausgewertet werden.

2.9.1 Qualitativ

Eine qualitative Analyse ist mittels Pulsed-wave erzeugter Doppler-Spektralkurven möglich. Sie geht auf GOSWAMY und STEPTOE (1988) zurück, die an der A. uterina ingravider Frauen erarbeitet und validiert wurden und eine Klassifizierung zur objektiven Beurteilung von Perfusionsverhältnissen vor allem des uterinen Blutflusswiderstands ermöglichen. Die Autoren unterschieden anhand definierter Merkmale des systolischen und diastolischen Blutflusses vier verschiedene Kurvenformen 0-C (Tabelle 0). Diese Klassifizierung wurde durch eine Studie von DICKEY et al. (1994) modifiziert und um die Formen D-III und N erweitert (Tabelle 0).

Tab. 0: Qualitative Analyse nach GOSWAMY und STEPTOE (1988); modifiziert nach DICKY at al. (1994)

Wellenformklassifizierung nach GOSWAMY und STEPTOE (1988)	Wellenformklassifizierung nach DICKY (1994)	Beschreibung	Bedeutung
0	D-IV	Kein diastolischer Blutfluss darstellbar	Schlechte Perfusion und hoher distaler Blutflusswiderstand
A	D-II	Diastolischer Blutfluss darstellbar aber keine Verbindung zur systolischen Blutflusskurve	Schlechte Perfusion und hoher distaler Blutflusswiderstand
B	D-I	Diastolischer Blutfluss gut darstellbar, vorangegangene systolische Blutflusskurve geht in diastolische Kurve über aber diese reicht nicht bis an die nächste systolische Kurve	Perfusion adäquat, Blutflusswiderstand niedrig,
C	C	Diastolische Blutfluss geht direkt in den nächsten hohen systolischen Fluss über	Sehr gute Perfusion und geringer Blutflusswiderstand
-	D-III	Blutfluss anwesend in mittlerer Diastole aber keine Verbindung zur	Schlechte Perfusion und hoher distaler Blutflusswiderstand

Literaturübersicht

		vorangegangenen oder folgenden systolischen Blutflusskurve	
-	N	Kein diastolischer und systolischer Blutfluss darstellbar	Keine Perfusion

2.9.2 Quantitativ

Quantitativ lässt sich die Perfusion anhand des Blutflussvolumens (BFV) und der Blutflussgeschwindigkeit (BFG) auswerten (WÜNSCHMANN 2007). Laut DICKEY (1997) entspricht das BFV dem tatsächlichen Blutfluss am ehesten. Allerdings ist die Berechnung sehr fehleranfällig, unter anderem aufgrund der Abhängigkeit vom Dopplerwinkel, der Querschnittsfläche des Gefäßes sowie dessen Verlauf (DICKEY 1997). Rechnerisch und bei Kenntnis des Insonationswinkels kann die BFG aus der Formel des zuvor beschriebenen Dopplershifts errechnet werden (HERZOG und BOLLWEIN 2007). Mittels PW-Doppler lässt sich die BFG auch direkt anhand der Fläche unterhalb der Dopplerspektralkurven ermitteln (WÜNSCHMANN 2007). BRÄNNSTRÖM et al. (1998) bestimmten mit Hilfe dieser Methode die BFG in periovulatorischen Follikeln von Frauen. HARTMANN et al. (2013) nutzten unter anderem die Berechnung des BFV, um anhand der uterinen Perfusion die Plazentareifung unter Einfluss von Glukokortikoiden zu beurteilen. In dieser Studie wurden die Tiere in zwei Versuchsgruppen aufgeteilt. Die Tiere in der „protrahierten Geburtseinleitungsgruppe“ erhielten kurzwirksames, niedrig dosiertes Dexamethason über mehrere Tage *ante partum*, während den Tieren in der „konventionellen Geburtseinleitungsgruppe“ einmalig hochdosiert Dexamethason injiziert wurde. In der genannten Studie konnten keine signifikanten Unterschiede des BFV zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden (HARTMANN et al. 2013). Wie oben angedeutet sind sowohl BFG und BFV vom Insonationswinkel abhängig. Dieser wird mathematisch mit Hilfe einer Kosinusfunktion korrigiert, da Schallstrahl und Gefäßachse während transkutaner Doppler-Sonographie nicht in einer Achse liegen (SCHÄBERLE 2010). Ein Winkel von 0° würde einem Kosinus von 1 entsprechen und hätte keinen rechnerischen Einfluss auf die Blutflussgeschwindigkeit. Je kleiner also der Insonationswinkel des Schallstrahls zur Gefäßachse, desto kleiner der Fehler bei der Berechnung der genannten Parameter (HERZOG und BOLLWEIN 2007). Folglich sind Insonationswinkel zwischen $40\text{-}60^\circ$ empfehlenswert (WÜNSCHMANN 2007).

2.9.3 Semi-quantitativ

Die Organperfusion kann indirekt durch die Ermittlung von Widerstand-Indizes wie zum Beispiel dem Resistenz (RI)- und Pulsatilitätsindex (PI) beurteilt werden (DICKY 1997). Anhand des peripheren Blutflusswiderstandes können Rückschlüsse auf die Perfusion gezogen werden. Ein hoher Widerstand bedeutet schlechte Perfusion, niedrige Werte lassen auf eine gute Durchblutung rückschließen. „Es handelt sich bei diesen Parametern um Verhältnisberechnungen aus der maximalen systolischen, der enddiastolischen und der mittleren Frequenzverschiebung des Herzzyklus.“ (BÜHLMAYER 1999). Da die Berechnung der Indizes auf dem von BÜHLMAYER (1999) beschriebenen Verhältnis beruht, sind diese unabhängig vom Insonationswinkel. Sie sind folglich geeignet, um Blutflüsse in kleinen, gewundenen Gefäßen zu ermitteln (DICKY 1997).

Der Resistenzindex (RI=Pourcelot Index) berechnet sich aus der Differenz zwischen maximaler systolischer Blutflussgeschwindigkeit (S_{BFG}) und enddiastolischer Blutflussgeschwindigkeit (D_{BFG}) geteilt durch S_{BFG} :

$$RI = (S_{BFG} - D_{BFG}) / S_{BFG}$$

(DICKY 1997).

Köster et al. (KÖSTER et al. 2001) ermittelten u.a. den RI des ovariellen Blutflusses bei Hündinnen, um damit ergänzend Rückschlüsse auf die zyklusabhängige Perfusion der Ovarien zu ziehen.

Der Pulsatilitätsindex (PI) hingegen berechnet sich aus der Differenz zwischen S_{BFG} und D_{BFG} geteilt durch die gemittelte maximale Blutflussgeschwindigkeit aus mehreren Herzzyklen (v_m):

$$PI = (S - D) / v_m$$

(DICKY 1997).

In einer Studie von BOLLWEIN et al. (2004) wurde der PI erfolgreich genutzt, um die uterine und ovarielle Perfusion während normaler, unbeeinflusster Sexualzyklen und unter Einfluss von Östradiolbenzoat und Altrenogest zu studieren.

2.9.4 Pixelanalytisch

Die pixelanalytische Perfusionsmessung ist eine Form der semi-quantitativen Analyse (BOLLWEIN et al. 2002; BROZOS et al. 2012; HERZOG et al. 2010). Sie beruht auf der Berechnung von Perfusionsparametern anhand der Anzahl und Helligkeit farbiger Pixel. ACOSTA et al. (2002, 2004) nutzten das Programm NIH Image program® (version 1.62; National Institutes of Health, Bethesda, MD) bei Kühen (2002) und Stuten (2004), um den Anteil farbiger Flächen von CL und Follikelwänden zu ermitteln. Bei POLISCA et al. (2013), BERGERON et al. (2013) und LANSBERGEN (2013) wurde die Bildanalyse hingegen mit ImageJ® (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) durchgeführt, um die Ovarperfusion zu bestimmen. Dabei wurden Einzelbilder aufgenommen und retrospektiv analysiert. Ein weiteres pixelanalytisches Programm ist PixelFlux® (Fa. Chameleon Software, Freiburg). Anders als bei vorherigen Programmen verarbeitet PixelFlux präferiert Videos, die mittels Farb- oder Power Doppler über einen Zeitraum von mehreren Herzzyklen aufzuzeichnen sind. Diese werden anschließend innerhalb einer zuvor definierten "Region Of Interest" (ROI) automatisch analysiert. Das Programm berechnet die perfundierte Fläche und die Blutflussgeschwindigkeit der farbigen Pixel jedes Einzelbildes des Videos, welche durch unterschiedliche Helligkeiten der Pixel codiert ist (SCHOLBACH et al. 2004). Dabei werden die erfassten Pixelfarbtöne mit einer zuvor justierten Farbskala verglichen (SCHOLBACH et al. 2004). Ferner erlaubt PixelFlux® die Berechnung der Blutflussintensität und der Widerstand-Indizes (SCHOLBACH et al. 2004). PixelFlux® erkennt die einzelnen Herzphasen, sodass alle Messungen herzphasenabhängig erfolgen und Perfusionsunterschiede innerhalb eines Herzzyklus registriert werden. Diese Art der Messungen wird als dynamisch bezeichnet (SCHOLBACH et al. 2004). Am Ende werden die für jedes Einzelbild des Videos ermittelten Werte über einen kompletten Herzzyklus gemittelt (SCHOLBACH et al. 2004). In der Veterinärmedizin wurde PixelFlux® in den letzten Jahren vor allem bei Kühen angewandt, um deren ovarielle Perfusion in der Lutealphase zu analysieren (BROCKHAN-LÜDEMANN 2009; HERZOG et al. 2011; BROZOS et al. 2012). So wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen Perfusionscharakteristika der Corpora lutea und deren Größe bzw. Progesteronkonzentrationen besteht (BROCKHAN-LÜDEMANN 2009). HERZOG et al. (2011) hingegen prüfte, ob sich die Bestimmung der Perfusion der Corpora lutea als Verfahren zur Frühträchtigkeitsdiagnostik eignet. Letztlich sei

BROZOS et al. (2012) genannt, die untersuchten, wie sich die Gelbkörperdurchblutung nach Gabe von Oxytocin verhält. Auch bei der Stute fand PixelFlux® Anwendung. Dabei wurde ein Kunststoffball intrauterin implantiert, um die Lutealphase künstlich zu verlängern oder humanes Choriongonadotropin (hCG) postovulatorisch gegeben und deren Effekte auf die Perfusion des Corpus luteum studiert (HAUER 2011; BIERMANN 2013). In einer weiteren Arbeit bei Stuten unter Verwendung von PixelFlux® erfolgten dopplersonographische Untersuchungen an der A. uterina, A. ovarica und dem Ovarhilus, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Perfusion und uteriner Kontraktionsaktivität nachzuweisen (RISSE 2011).

3 Publikation

Die Konzeption der Publikation zu Grunde liegenden Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Kauffold, Dr. Sigmarsson und meiner Mitdotorandin Frau Herlt. Die Versuche wurden von mir in Zusammenarbeit mit Frau Herlt durchgeführt. Dr. Hoops, Dr. Sigmarsson und Frau Legler waren gelegentlich beteiligt. Dr. Sigmarsson war des Weiteren für die Lösung technischer Probleme verantwortlich. Die Erarbeitung eines Konzeptes zur Einteilung der Jungsauen in die entsprechenden Zyklusphasen anhand ihres B-Mode sonographischen Ovarbefundes erfolgte gemeinsam mit Prof. Dr. Kauffold und Frau Herlt. Die Erarbeitung des Inhaltes des Material und Methoden Teils der Publikation erfolgte gemeinsam mit Frau Herlt. Die Auswertung der generierten Doppler Daten des ovariellen Blutflusses erfolgte ausschließlich eigenständig. Dies beinhaltete die Durchsicht und Auswahl des Videomaterials und anschließende Auswertung mittels PixelFlux®. Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch Frau Bettina Hentschel eigenständig. Alle weiteren Abschnitte des nachfolgenden Manuskriptes verfasste ich eigenständig. Prof. Dr. Kauffold prüfte die Publikation kritisch und lieferte konstruktive Hinweise und Verbesserungsvorschläge.

Feasibility of transabdominal Doppler ultrasonography for studying ovarian blood flow characteristics in cycling gilts

Eignung der transabdominalen Doppler-Ultraschallsonografie zur Charakterisierung der ovariellen Blutversorgung zyklischer Jungsauen

Authors

Rosa Stark*, Catherine Herlt*, Haukur L. Sigmarsson, Johannes Kauffold

*The authors contributed equally to the study.

Institute

Clinic for Ruminants and Swine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany

Schlüsselwörter

Jungsauen, Sexualzyklus, Ovarperfusion, Color-Doppler-Ultraschallsonografie

Key words

Gilts, estrous cycle, ovarian perfusion, color Doppler ultrasonography

received 24.08.2018

accepted 26.11.2018

Bibliography

DOI <https://doi.org/10.1055/a-0858-0076>

Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere 2019; 47: 1–9

© Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York ISSN 1434–1220

Correspondence address

Prof. Dr. Johannes Kauffold

Clinic for Ruminants and Swine

Faculty of Veterinary Medicine

University of Leipzig

An den Tierkliniken 29

Zusammenfassung

Ziel Die Arbeit hatte zum Ziel, den ovariellen Blutfluss von Jungsauen während des Sexualzyklus mittels transabdominaler Color-Doppler-Ultraschallsonografie zu charakterisieren. **Material und Methode** Bei 15 Jungsauen wurden Brunst sowie Ovulation synchronisiert. Im darauffolgenden spontanen Zyklus wurden die Tiere täglich sonografisch untersucht und perfundierte Areale im Bereich des Ovarhilus und Ovargewebes dargestellt, um den Blutfluss zu charakterisieren. Die Ermittlung des ovariellen Blutflusses erfolgte durch Analyse aufgezeichneter Videosequenzen mit der Software PixelFlux® und Bestimmung der Parameter perfundierte Fläche (Amix), Blutflussgeschwindigkeit (vmix) sowie Resistenz- (Rlvmix) und Pulsatilitätsindex (Plvmix). **Ergebnisse** Alle Blutflussparameter zeigten einen zyklusabhängigen Verlauf. Amix und vmix waren im Diöstrus am höchsten, gefolgt vom Proöstrus, während sich Rlvmix und Plvmix umgekehrt proportional verhielten. **Schlussfolgerung und klinische Relevanz** Die transabdominale Color-Doppler-Ultraschallsonografie erwies sich als geeignet, um die Durchblutung der Ovarien von in einem Stand immobilisierten Jungsauen zu untersuchen. Der ovarielle Blutfluss war abhängig von der Phase des Sexualzyklus und am höchsten im Diöstrus. Die Ergebnisse dieser Arbeit ermutigen, die Color-Doppler-Ultraschallsonografie zur Untersuchung von Ursachen ovarbedingter Fruchtbarkeitsstörungen wie Gelbkörperinsuffizienz oder saisonaler Effekte auf die Funktion des Ovars zu nutzen.

Abstract

Objective The aim of this study was to assess ovarian blood flow characteristics by applying transabdominal color Doppler ultrasonography during the course of the estrous cycle in gilts. **Materials and methods** Estrus and ovulation were synchronized in 15 pubertal gilts. During their consecutive spontaneous estrous cycle the gilts were sonographically scanned daily and ovarian blood flow was determined by imaging perfused areas of the ovarian hilus and the ovarian tissue. Recorded video clips were then analyzed for the parameters perfused area (Amix), blood flow velocity (vmix) as well as resistance (Rlvmix) and pulsatility index (Plvmix) using the software PixelFlux®. **Results** All blood flow parameters showed an estrous cycle dependent course, with Amix and vmix being highest in diestrus, followed by proestrus, while Rlvmix and Plvmix patterns were inversely proportional.

Conclusion and clinical relevance Transabdominal color Doppler ultrasonography proved feasible to study ovarian perfusion characteristics in pubertal gilts. The ovarian blood flow was dependent on the stage of estrous cycle and highest in diestrus. The results of this study encourage the use of color Doppler ultrasonography to also investigate reasons of ovary-caused infertility including corpus luteum insufficiency or seasonal effects on ovary function.

Introduction

Over the last 20 years, B-mode ultrasonography has been established as a powerful tool in pig reproduction. The ovary has been carefully defined thus enabling for the recognition of almost all ovarian bodies including follicles of different size, corpora haemorrhagica (CH), corpora lutea (CL) as well as of pathological conditions such as ovarian cysts [17]. Doppler ultrasonography is another ultrasound technology that has been proven to be very complementary to conventional B-mode ultrasound for various reproductive purposes in different mammalian species including rodents [5], mares [7], ewes [12], cows [16] as well as bitches [26]. As for ovary scanning, Doppler ultrasonography has been used e. g. for the differentiation of follicular and luteal cysts [29] as well as of ovulatory and non-ovulatory follicles [12].

Generally, ovarian blood supply, as studied by Doppler ultrasonography, has been shown to depend on the stage of estrous cycle e. g. in cows [3], bitches [6], mares [9] and women [33]. There are only a few studies available on perfusion characteristics of the reproductive tract of female pigs. Previous investigations based on the use of electromagnetic blood flow transducers, sonographic contrast medium or indicator substances such as radioactive agents [14], [23], [27], [28]. More recently, Brüssow et al. [11] have employed Doppler sonography through a minimal invasive laparoscopic approach to study perfusion characteristics of pig fetuses. Most recently, Herlt et al. [15] have tested three different Doppler methods (i. e. color, power and pulse wave Doppler) to investigate perfusion characteristics of the uterus of crated cyclic gilts [15]. Color, but not power and pulse wave Doppler, proved feasible for this purpose. With color Doppler it could be clearly shown that the perfusion characteristics of the uterus of gilts changed according to the stage of estrous cycle, as it was previously demonstrated also for the ovary in bitches [6], [20],

cows [22] and mares [34]. Doppler ultrasonography has, however, never been employed to study perfusion characteristics of the pig's ovaries, which was the aim of this study. However, since power and pulse wave Doppler proved not feasible in the study of Herlt et al. [15] and this was the same for ovary scanning with identical constraints in this study, only results generated with color Doppler are presented herein.

Materials and methods

Animals and general study design

This study was performed in conjunction with the investigation on uterine perfusion characteristics of Herlt et al. [15] and was approved by the Saxonian Committee for Animal Welfare (No.: TVV 05/14). The animals used as well as the general study design were thus identical to the study of Herlt et al. [15] and will only be briefly repeated here for main relevant information: A total of 15 reproductively healthy pubertal gilts (German Landrace x Pietrain) with an average age of 253.3 ± 12.2 days and average weight of 148.0 ± 12.1 kg, respectively, were included. Gilts were kept in pens with 2 gilts per pen on partially slatted floors. Commercially purchased feed was offered twice a day and water ad libitum. The gilts were hormonally synchronized for estrus and ovulation (using an altrenogest-eCG-GnRH protocol) in the attempt to have them in a similar stage of estrous cycle when color Doppler ultrasonography of the ovaries started.

For scanning, gilts were moved into a purpose-designed mobile crate (see Herlt et al. [15]) that was equipped with sliding bars on both sides to allow an easy access to the scanning area, i. e. the right and left inguinal area of the gilts. Feed was dropped onto the floor of the crate in order to additionally distract and thus "immobilize" especially nervous gilts. Scanning was generally done by transabdominal ultrasonography as described by Kauffold and Althouse [17] and subsequently employed by Herlt et al. [15]. The ultrasound unit used was a transportable Fazone CB Fujifilm (Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, Germany; distributed by Physia GmbH, Neu-Isenburg, Germany) equipped with a 3–9 MHz convex array probe (FZT C9–3). Scanning started the day post GnRH-treatment that was used for induction of ovulation and was continued throughout the synchronized as well as the following

spontaneous estrous cycle until the 3rd ovulation (i. e. following the spontaneous cycle). Scanning was always done in the morning by one of two investigators (CH and RS). For ovary scanning, only one (i. e. usually the right ovary) was scanned as it is assumed to sufficiently reflect the ovarian status as well as stage of estrous cycle [24]. Based on the ovarian bodies imaged (i. e. follicles of different size, CH and CL), and in accordance with a previous study on the morphology of the ovarian bodies [30], the gilts were allocated to the four stages of the estrous cycle as described by Herlt et al. [15]: proestrus, estrus, metestrus and diestrus. Moreover, pathological ovarian conditions such as ovarian cysts were recorded [17].

Scanning of the ovaries to determine perfusion characteristics

Scanning of the ovaries to determine perfusion characteristics always started with a B-mode scan in order to clearly visualize the ovary using standardized settings (frequency: 6 MHz, gain: 84 dB; penetration depth: 6 cm). During scanning, B-mode video sequences of the whole ovary were recorded in order to subsequently measure the diameter of ovarian bodies that were actually present (at least 3 bodies, i. e. follicles and CL, were measured and averaged to give the mean diameter/body/day/gilt). B-mode scanning was followed by color Doppler ultrasonography, again always using the same settings (frequency: 3.5 MHz, gain: 70 dB, penetration depth: 6 cm). The probe was held as still as possible to avoid pixel artifacts due to animal movements. To reduce aliasing, the maximum color flow velocity was individually adjusted [31] and differed between 25–83 cm/s. During color Doppler ultrasonography, the ovarian hilus and the ovary itself were imaged. After perfused areas of the ovarian hilus and within ovarian tissue were clearly identified, video clips of at least 4 seconds (6.10 ± 2.07 s) were generated to record as many complete heart cycles as possible. One single image and one video clip were recorded per gilt per day.

Analysis of color Doppler signals to define perfusion characteristics of the ovary

For conversion of the recorded video clips into avi files and the perfusion analysis of these clips, the computer programs Micro-Dicom[®] 0.9.1 (Simeon Antonov Stoykov, Sofia, Bulgaria) and PixelFlux[®] (Chameleon Software GmbH, Münster, Germany)

were used. Prior to analysis, PixelFlux[®] was calibrated for each video clip for maximum color flow velocity, color bar and distance [31], [32]. Perfused areas of the ovarian hilus and within ovarian tissue were then outlined manually (**Fig. 1**) to define the region of interest (ROI) of on average of $6.96 \pm 1.96 \text{ cm}^2$ in size (a standardized rectangle to define the ROI as used in the study of Herlt et al. [15] was not possible to be employed due to variations in the size of the ovaries depending on the stage of estrous cycle and of ovarian bodies that were present). The area within the ROI was then automatically analyzed for the number and brightness of colored pixels over the length of the whole video clip [31]. Those parts of the video clip that did not or only incompletely cover perfused hilar and ovarian tissue areas, or were affected by movement related artifacts or aliasing, were removed from the clip. However, the remaining clip that was available for analysis was always as long as two complete heart cycles ($2.46 \pm 1.29 \text{ s}$). This cleared video clip was then used to calculate the mixed (i. e. independent of blood flow direction; mix) perfusion parameters: perfused area (A_{mix}), blood flow velocity (v_{mix}), resistance index (RI_{vmix}) and the pulsatility index (PI_{vmix}) [32]. As reported by Herlt et al. [15], the values obtained per gilt per day were then averaged for each parameter to give the mean value per day. Other than in the study of Herlt et al. [15], the ovarian blood flow intensity (I_{mix}) was not analyzed in this study. Since I_{mix} is proportional to the perfused area defined by the ROI, and the ROI could not be standardized in this study, an analysis and subsequent comparison for individual gilts for successive scanning sessions or among gilts for the same day of scanning were impossible.



Fig. 1 Image of an ovary of a gilt with corpora lutea (x) in diestrus generated with transabdominal color Doppler ultrasonography. The white line was drawn manually using a recorded video clip and outlines the region of interest covering perfused ovarian areas (hilus and ovarian tissue) for which the blood flow was analyzed. ©R.Stark.

Abb. 1 Mittels transabdominaler Color-Doppler-Ultraschografie generiertes Bild eines Ovars einer Jungsau mit Corpora lutea (x) im Diöstrus. Die weiße Linie wurde unter Nutzung eines aufgezeichneten Videoclips manuell eingezeichnet. Sie begrenzt die „region of interest“, welche die perfundierte Ovarfläche (Hilus und ovarielles Gewebe) umschließt und für die der Blutfluss analysiert wurde. ©R.Stark.

Statistical analysis

As done by Herlt et al. [15], also in this study “...it was decided to use only data obtained from the spontaneous estrous cycle that followed the synchronized cycle (i. e. proestrus – diestrus) to avoid potential biases due to the hormones used and to adjust for individual variations in the length of single stages of the spontaneous estrous cycle to allow for an unbiased descriptive characterization and finally a statistical comparison (**Fig. 2**).” In consequence, the number of values/parameter that was available per day per stage of the estrous cycle varied (**Fig. 2**). Statistical analysis was done using the software IBM SPSS (version 22.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and was performed equally (except for Imix that was not analyzed in this study; see above) to the study of Herlt et al. [15]: “All values for the parameters vmix, ...Amix, Rlvmix and Plvmix were averaged per day (P1 – D16; **Fig. 2**) and plotted as

means (\pm SEM) onto error bar graphs. In order to detect differences over the course of the estrous cycle, each parameter was compared between stages (...). For stage comparison, all values (i. e. from all gilts) obtained for each of the stages were pooled and then analyzed using the Friedman and Wilcoxon tests as well as the Bonferroni correction. Relationships between parameters were evaluated using Pearson's (linear) or Spearman's correlation (non-linear). A p-value of < 0.05 was considered significant."

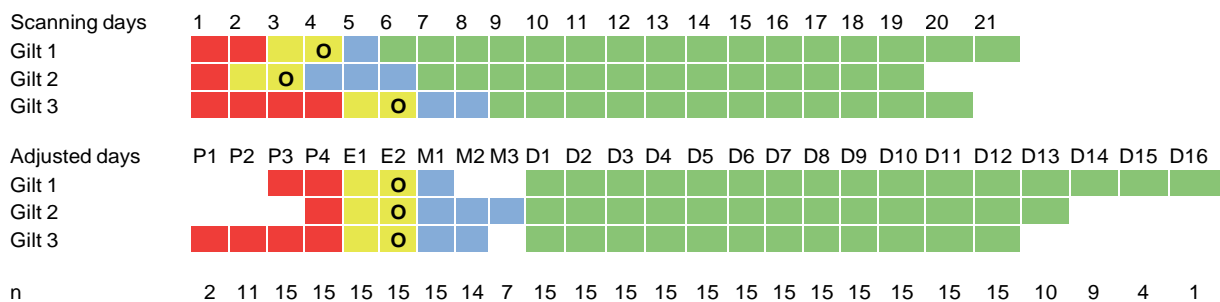


Fig. 2 Schematic illustration of the data sets prior (above) and after (below) adjustment on the example of three gilts, and the total number of values/parameter per day and stage of the estrous cycle that was available for statistical analysis. O: ovulation corresponding to estrus (E; yellow) day 2. Proestrus (P; red); metestrus (M; blue); diestrus (D; green). Taken from Herlt et al. [15]. ©C.Herlt.

Abb. 2 Schematische Darstellung der Datensätze vor (oben) und nach (unten) der Anpassung am Beispiel von drei Jungsauen sowie Gesamtzahl der Werte/Parameter pro Zyklustag und -abschnitt, die für die statistische Analyse verfügbar war. O: Ovulation korrespondierend zum Tag 2 des Östrus (E; gelb). Proöstrus (P; rot); Metöstrus (M; blau); Diöstrus (D; grün). Aus Herlt et al. [15]. ©C.Herlt.

Results

Ovarian bodies imaged over the course of the estrous cycle Ovarian bodies imaged included small, medium and large sized follicles ranging between 3.17 mm and 6.93 mm in size. The size was 5.69 ± 0.68 mm at the end of proestrus and 5.74 ± 0.97 mm prior to ovulation. All gilts included ovulated. The size of CL reached $7.94 \text{ mm} \pm 0.55$ mm on day 10 of the estrous cycle before starting to regress on day 14 with a mean diameter of 7.43 ± 0.81 mm. Four gilts developed single CL cysts in diestrus.

Feasibility of color Doppler ultrasonography to characterize ovarian perfusion

Generally, color Doppler ultrasonography proved feasible to image the ovaries sufficiently enough to perform perfusion analyses. Only in a few cases, intestines led to an obliteration of perfused ovarian structures. In another situation, a filled and thus extended urinary bladder resulted in a dislocation of ovarian structures, which was then solved by applying increasing pressure onto the abdominal wall in order to successfully image the ovaries. Color flow signals were obtained from the hilar region of the ovary (**Fig. 3b**) and from specific ovarian bodies, i. e. CL (**Fig. 3c**) and CL cysts, as well as from stromal tissue, whereas follicles regardless of size and CH were always Doppler negative (**Fig. 3a**). Unfortunately, a definite anatomical assignment of ovarian vessels particularly of those supplying the ovary (i. e. A. ovarica and branches) was impossible.

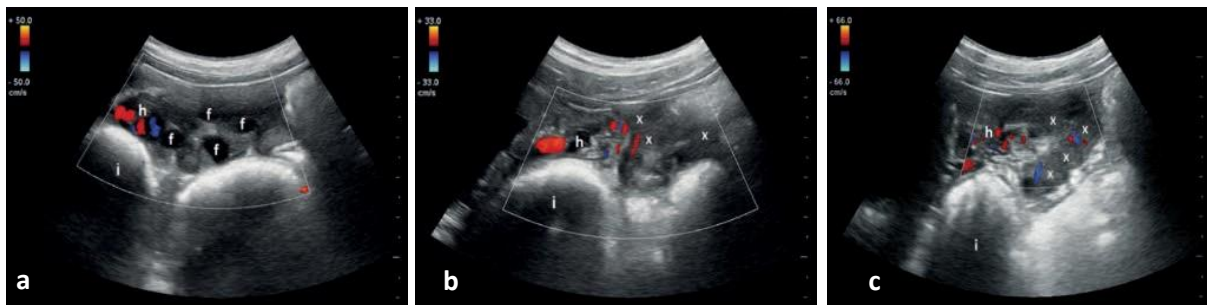


Fig. 3 Images of ovaries of gilts generated with transabdominal color Doppler ultrasonography. **a** Early estrus with follicles (f). **b** Late estrus post ovulation with corpora haemorrhagia (CH) (x). **c** Diestrus with corpora lutea (CL) (x). Hilar region (h). “i” indicates reflections through intestines. The colored areas indicating detectable blood flow were either within the hilar region or ovarian tissue of ovaries bearing CL (c). Follicles and CH were devoid of color signals (a). Scale bar on the right margin in cm.

©R.Stark.

Abb. 3 Mittels transabdominaler Color-Doppler-Ultraschografie generierte Bilder von Ovarien von Jungsauen. **a** Früher Östrus mit Follikeln (f). **b** Später Östrus nach Ovulation mit Corpora haemorrhagia (CH) (x). **c** Diöstrus mit Corpora lutea (CL) (x). Ovarhilus (h). Reflexionen durch Darm (i). Die Farbsignale, die messbaren Blutfluss darstellen, stammten entweder vom Ovarhilus oder von Ovargewebe mit CL (c). Follikel und CH zeigten keine Farbsignale im Doppler-ultraschografischen Bild (a). Skala am rechten Rand in Zentimetern. ©R.Stark.

Characteristics of the ovarian perfusion during the estrous cycle as determined by color Doppler ultrasonography Each of the recorded blood flow parameters, i. e. vmix and Amix as well as Rlvmix and Plvmix, showed characteristic patterns throughout the monitored days of the estrous cycle in gilts.

Vmix (**Fig. 4**) was relatively high in proestrus, decreased toward estrus to steadily increase until mid-diestrus to decrease again. A similar course was observed for the parameter Amix (**Fig. 5**). These patterns were somehow reflected by stage comparison, with low values in estrus and high in diestrus.

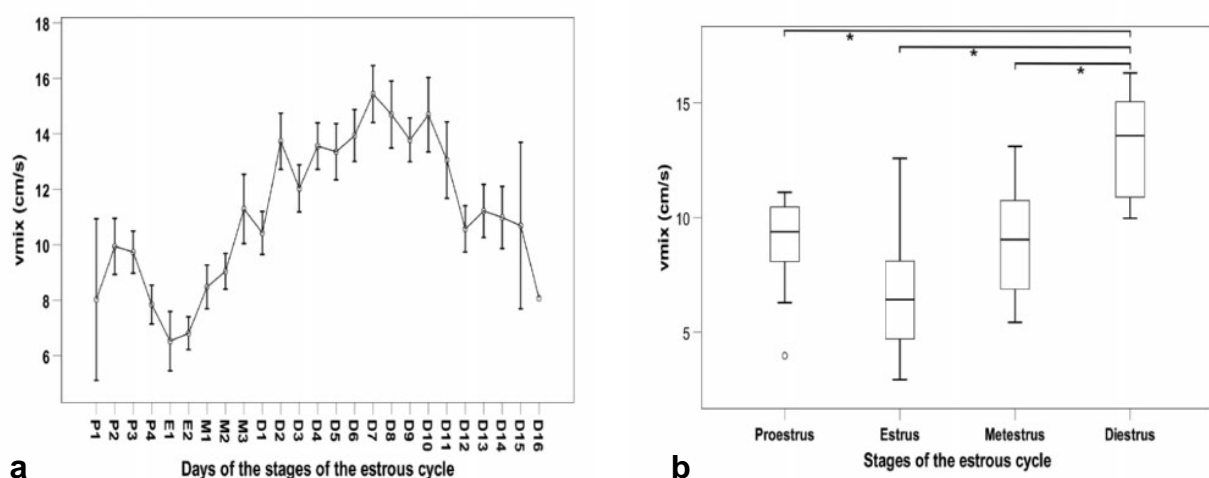


Fig. 4 Blood flow velocity (vmix) over the course of the estrous cycle (a) and for the stages of the estrous cycle (b). Values were adjusted as detailed in [Fig. 2] and given as mean \pm SEM whenever 2 or more values/day/parameter were available. **a** P1–4: proestrus day 1–4; E1–2: estrus day 1–2; M1–3: metestrus day 1–3; D1–16: diestrus day 1–16. **b** All available values/stage were pooled and analyzed. * $p = 0.001$. ©R.Stark.

Abb. 4 Blutflussgeschwindigkeit (vmix) über den Verlauf des Zyklus (a) und für die Zyklusphasen (b). Die Werte wurden, wie in [Abb. 2] beschrieben, angepasst und als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben, wenn 2 oder mehr Werte pro Tag und Parameter verfügbar waren. **a** P1–4: Proöstrus Tag 1–4; E1–2: Östrus Tag 1–2; M1–3: Metöstrus Tag 1–3; D1–16: Diöstrus Tag 1–16. **b** Alle verfügbaren Werte wurden pro Zyklusabschnitt gepoolt und analysiert. * $p = 0,001$. ©R.Stark.

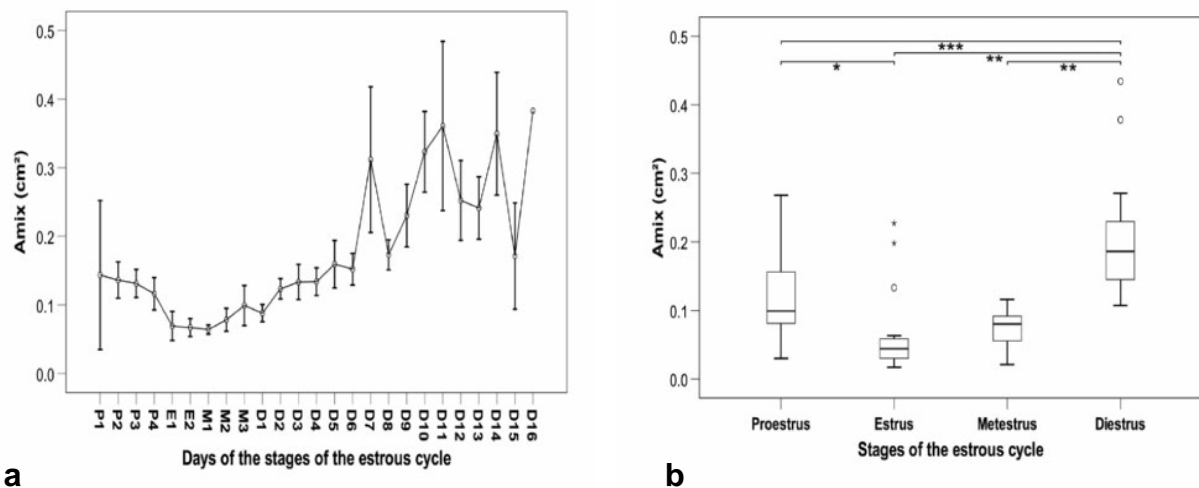


Fig. 5 Perfused area (Amix) over the course of the estrous cycle (a) and for the stages of the estrous cycle (b). For details refer to **Fig. 4**. * $p = 0.006$; ** $p = 0.001$; *** $p = 0.003$. ©R.Stark.

Abb. 5 Perfundierte Fläche (Amix) über den Verlauf des Zyklus (a) und für die Zyklusphasen (b). Details siehe **Abb. 4**. * $p = 0,006$; ** $p = 0,001$; *** $p = 0,003$. ©R.Stark.

RIvmix and Plvmix similarly changed over the course of the estrous cycle (**Fig. 6**, **Fig. 7**), but almost inversely proportional to vmix and Amix. Mean values decreased toward the end of proestrus, then increased in estrus to decrease again already in metestrus toward mid-diestrus. A final slight (Plvmix) or moderate (RIvmix) increase was again observed at the end of diestrus. Again, these patterns were nicely reflected by stage comparison, with high values in estrus and low values in diestrus.

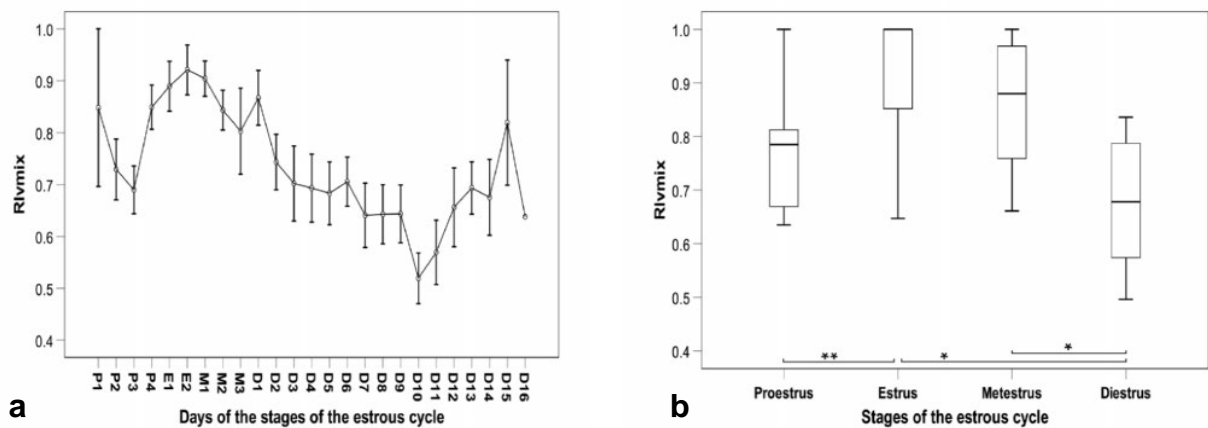


Fig. 6 Resistance index (Rlvmix) over the course of the estrous cycle (a) and for the stages of the estrous cycle (b). For details refer to **Fig. 4**. * $p = 0.001$; ** $p = 0.004$.

©R.Stark.

Abb. 6 Resistenzindex (Rlvmix) über den Verlauf des Zyklus (a) und für die Zyklusphasen (b). Details siehe **Abb. 4**. * $p = 0,001$; * $p = 0,004$. ©R.Stark.

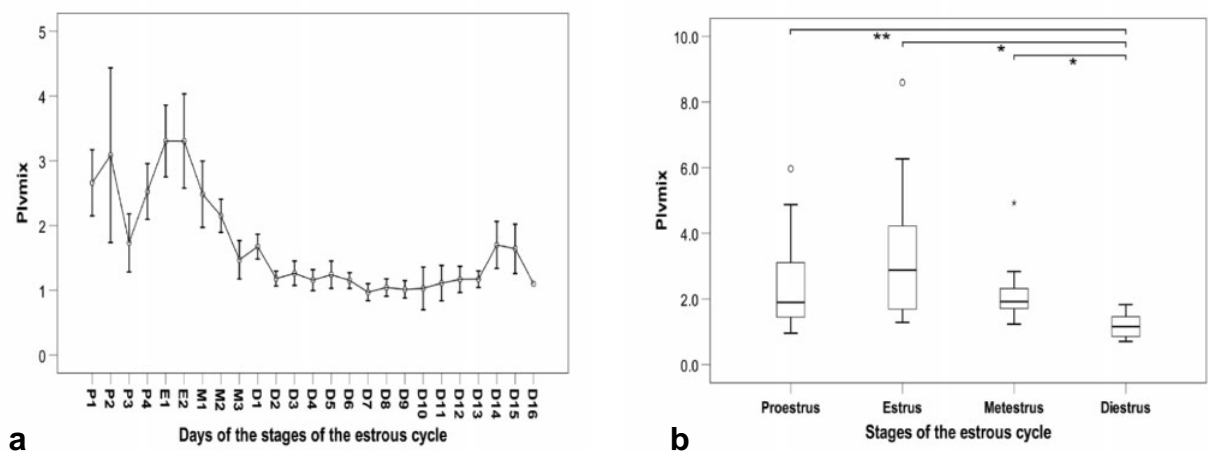


Fig. 7 Pulsatility index (Plvmix) over the course of the estrous cycle (a) and for the stages of the estrous cycle (b). For details refer to **Fig. 4**. * $p = 0.001$; ** $p = 0.003$.

©R.Stark.

Abb. 7 Pulsatilitätsindex (Plvmix) über den Verlauf des Zyklus (a) und für die Zyklusphasen (b). Details siehe **Abb. 4**. * $p = 0,001$, ** $p = 0,003$. ©R.Stark.

The ovarian blood flow parameters vmix and Amix showed a medium to strong significant positive correlation in proestrus and estrus, as did Rlvmix and Plvmix in estrus and diestrus (**Table 1**). In contrast, vmix showed a medium significant negative correlation with Rlvmix in proestrus and estrus and with Plvmix in estrus and metestrus. Amix and Rlvmix exhibited a medium significant negative correlation in all stages, whereas Amix and Plvmix values correlated highly negative in all stages of the estrous cycle but proestrus.

Table 1 Relationship between blood flow parameters as determined by color Doppler sonography according to the stage of estrous cycle (n = 15 gilts). P1–4: proestrus day 1–4; E1–2: estrus day 1–2; M1–3: metestrus day 1–3; D1–16: diestrus day 1–16. All values (i. e. from all gilts) obtained for each of the stages were pooled and analyzed (see **Fig. 2**). vmix: blood flow velocity; Amix: perfused area; Rlvmix: resistance index; Plvmix: pulsatility index; r: correlation coefficient. a: Pearson correlation coefficient for linear relationships, otherwise Spearman correlation. A p-value of < 0.05 was considered significant.

Tab. 1 Zusammenhänge zwischen den mittels Color-Doppler-Ultrasonografie ermittelten Blutflussparametern in den einzelnen Zyklusabschnitten (n = 15 Jungsauen). P1–4: Proöstrus Tag 1–4; E1–2: Östrus Tag 1–2; M1–3: Metöstrus Tag 1–3; D1–16: Diöstrus Tag 1–16. Alle ermittelten Werte (d. h. von allen Jungsauen) wurden pro Zyklusabschnitt gepoolt und analysiert (siehe **Abb. 2**). vmix: Blutflussgeschwindigkeit; Amix: perfundierte Fläche; Rlvmix: Resistenzindex; Plvmix: Pulsatilitätsindex; r: Korrelationskoeffizient. a: Pearson-Korrelationskoeffizient bei linearen Zusammenhängen, anderenfalls Spearman-Korrelationskoeffizient. Ein p-Wert < 0,05 galt als signifikant.

Parameter		Proestrus (P1–4)		Estrus (E1–2)		Metestrus (M1–3)		Diestrus (D1–16)	
		r	p	r	p	r	p	r	p
vmix	Amix	0.599 ^a	0.018	0.880 ^a	0.000	0.448	0.094	–0.398	0.142
	RIvmix	–0.582 ^a	0.023	–0.613 ^a	0.015	–0.430	0.109	0.318	0.248
	PIvmix	–0.431	0.109	–0.687 ^a	0.005	–0.692 ^a	0.004	0.276	0.319
Amix	RIvmix	–0.728 ^a	0.002	–0.653 ^a	0.008	–0.661 ^a	0.007	–0.740 ^a	0.002
	PIvmix	–0.407	0.133	–0.822	0.000	–0.679 ^a	0.005	–0.758 ^a	0.001
RIvmix	PIvmix	0.380	0.162	0.769	0.001	0.460	0.084	0.934 ^a	0.000

Discussion

To the authors' knowledge this is the first report on the use of transabdominal Doppler ultrasonography to study the ovarian blood flow during the estrous cycle in gilts. As already recently reported by Herlt et al. [15] using the same gilts to study uterine blood flow characteristics, color, but not power and pulse wave Doppler (not detailed herein) proved suitable for studying the perfusion characteristics of the gilt's ovaries.

In this study the ovary was always positive for color Doppler signals. In particular, Doppler signals were obtained from CL, the wall of CL cysts, the ovarian hilar region as well as stromal tissue, but never from the wall of follicles. The latter observation is different to what has been observed in cows, where follicle walls were also Doppler positive [3]. Compared to other ovarian compartments, follicles are relatively sparsely perfused. Moreover, as also observed in cows [13], the blood flow velocity was low during estrus in this study (see below). Generally, a low blood flow velocity requires a low pulse repetition frequency, i. e. a decrease of the maximum color flow velocity for detection. However, the lower the maximum color flow velocity is, the more susceptible is color Doppler ultrasonography for any movements caused by the subjects scanned or the person that performs the scanning, finally resulting in a complete failure for the measurement of low blood velocities. This is certainly the main reason when comparing the actual results with those of the aforementioned study in cows: gilts never kept still, while cows did so. An identical conclusion was

drawn from the recent study of Herlt et al. [15] in which it was also not possible to measure low blood flow velocities of uterine tissues in gilts. Another reason, as also already discussed by Herlt et al. [15], was certainly the transabdominal approach of scanning in this study where lots of other tissues/organs were located in between the probe and the “object of interest” (in this case the ovary), thus leading to an exhaust of energy during its way traveling through the body. This is not the case with either transrectal [1] or transvaginal [4] scanning where the “object of interest” is close to the probe. However, the transabdominal approach was purposely chosen in this study. While it might be possible to perform transrectal scanning in gilts/sows in general [18], this procedure has limitations over transabdominal scanning effecting its feasibility for Doppler ultrasonography: narrow pelvis (at least in gilts); small rectum size; laborious; may cause rectal inquiries; scanned animals may experience more discomfort and would thus move more heavily, thus further decreasing the ability to measure especially low blood velocities.

In this study using transabdominal scanning it was impossible to assign Doppler signals obtained especially at the hilar region to the main vessel supplying the ovary, i. e. the A. ovarica. This is different to uterine perfusion studies in mares and women where it was possible to unambiguously identify specific blood vessels of the reproductive tract when either transvaginal or transrectal scanning was employed [4], [8]. The failure of this study to clearly identify the vessel was likely due to the facts that, a) because of transabdominal scanning, the vessel could not be directly approached (as it is possible with transrectal and transvaginal scanning) and b) the specific anatomy of the vessel supplying the ovary with lots of anastomosing and winding branches exacerbated a clear identification [25].

The blood flow parameters used in this study were blood flow velocity (v_{mix}), perfused area (A_{mix}) as well as resistance (R_{Ivmix}) and pulsatility index (PI_{vmix}). A similar mix of parameters was previously employed to characterize ovarian perfusion in other species such as bitches [20] and mares [34]. Moreover, also Herlt et al. [15] used the aforementioned parameters in order to study uterine perfusion characteristics in gilts by transabdominal scanning. However, Herlt et al. [15] were also able to determine the uterine blood flow intensity which proved impossible in this study. The blood flow intensity is proportional to the perfused area as defined by the ROI [32]. While Herlt et al. [15] were able to standardize their ROIs by using a

rectangle of a defined size, an equivalent standardization was impossible in this study due to variations in the size of the ovaries. Taken together results indicate that the quartet parameters of vmix, Amix as well as Rlvmix and Plvmix are suitable to determine ovarian blood flow characteristics in gilts when using transabdominal color Doppler ultrasonography.

The patterns of vmix and Amix, i. e. a decrease in proestrus with low values in estrus followed by an increase in metestrus with high values in most parts of diestrus as determined in this study have also been observed in ewes (velocity; [10]) and mares (perfused area; [34]). Moreover, the courses of vmix and Amix as determined in this study proved identical to the course of the ovarian blood flow volume in sows as studied daily for whole estrous cycles by an electromagnetic blood flow transducer surgically placed around an ovarian artery [23]. Additionally, the high ovarian Amix values in most parts of diestrus in this study were similar to findings in a power Doppler study conducted in mares [34]. As also determined in this study, Rlvmix and Plvmix were inversely related to vmix and Amix, and were both low in most parts of diestrus, as it was also demonstrated for Rlvmix in mares [34]. The patterns observed in this study for ovarian perfusion characteristics do agree with those obtained in the investigation of Herlt et al. [15] for uterine perfusion using the same gilts in so far as they also showed a more or less specific course, respectively, for the days studied. Another agreement is that vmix and Amix as well as Rlvmix and Plvmix displayed paralleled albeit inversely related patterns.

However, there are also a few differences: In the study of Herlt et al. [15], vmix and Amix were high in proestrus and estrus and low in diestrus, while at the same time, Rlvmix and Plvmix performed inversely proportional. As aforementioned, it was the opposite in this study. This “discrepancy” might be, at least in part, a “methodological phenomenon”: Herlt et al. [15] were only rarely able to measure blood flow velocities of uterine tissue in either of the stages studied, and mostly measured vessels in between uterine cross-sections located within the broad ligament. In the follicular phase, when estrogens are high, these vessels were likely dilated leading to a higher blood supply [14] as seen on high values of vmix and Amix for uterine perfusion [15]. In this study, the ovarian tissue in the follicular phase was predominated by follicles that were devoid of color Doppler signals, and the prevailing part of the signals measured came from the ovarian hilar region. Since the hilar region was not

separately analyzed rather than being part of the “total ovarian perfusion” it could be that a presumably higher hilar perfusion in the follicular phase was overwritten by Doppler-devoid ovarian tissue areas that always covered most parts of the ROIs.

However, there could be also other reasons for the aforementioned different results of this study and the study of Herlt et al. [15] which are also hormone dependent. It is known that blood is supplied from the uterus toward the ovary and vice versa via anastomoses built between the A. ovarica and the A. uterina [25], and that this phenomenon changes over the course of the estrous cycle. This mechanism has been clearly shown for cows [13]. In both cows and sows, the blood flow volume supplying the ovary was found to increase significantly during the luteal phase [13], [23]. This might be attributed to a change of the direction of the blood flow through the aforementioned anastomosing vessels toward the ovary. During the luteal phase, corpora lutea release progesterone, which leads to a vasoconstriction of the uterine artery in sows [14]. As assumed by Ford and Chenault [13] for cows “the increased resistance to blood flow in the uterus during the luteal phase of the cycle may allow the uterine artery to participate in supplying the blood to the CL bearing ovary through the uterine branch of the ovarian artery”. This hypothesis is supported by findings of Lamond et al. [21] who detected an increase of the diameter of the anastomoses between the A. uterina and the R. uterinus of the A. ovarica in the luteal phase in cows [21]. Finally, it is known that corpus luteum development is associated with angiogenesis [2] that then also contributed to an increased blood supply of the ovary in diestrus as observed in this study based on high vmix and Amix values. In mid-diestrus, the porcine endometrium releases $\text{PGF}_{2\alpha}$ which initiates functional luteolysis as shown in cows by “upregulating mRNA for vasoconstrictive factors within the CL” [2], leading to a steady decline of progesterone production and, consequently, also of blood supply in late diestrus as reflected by decreased vmix and Amix values in this study. This observation is in accordance with results obtained by Rathmacher and Anderson [28] who also observed a decrease in blood supply of porcine corpora lutea during late diestrus using a radioactive agent (i. e. rubidium chloride [$^{86}\text{RbCl}$]). At the same time when progesterone declines, estrogen concentrations increase due to developing follicles which then cause vasodilation of the A. uterina and may reverse the blood flow through anastomoses henceforth to the uterus [13], [14].

Conclusion for practice

After Herlt et al. [15] have recently shown, for the first time, that transabdominal color Doppler ultrasonography is feasible to study uterine perfusion characteristics during the estrous cycle in created gilts, this is the second report of the successful use of this technology on the example of ovary scanning. Using color Doppler ultrasonography it could be demonstrated that ovarian perfusion was higher in diestrus than in all other three stages of the estrous cycle. The results of this study encourage for further investigations i. e. into ovary related infertility such as corpus luteum insufficiency or seasonal effects on ovary functions.

Funding sources

The study was supported financially by the German Federal Environmental Foundation (Osnabrück, Germany) and the Veyx Pharma GmbH (Schwarzenborn, Germany).

Conflict of interest

None of the authors have any conflict of interest to declare.

Acknowledgement

The authors would like to thank Nadja Legler and Dr. Matthias Hoops for their help during the study. We also thank the farm staff for taking care of the experimental animals and the German Federal Environmental Foundation (Osnabrück, Germany) as well as the Veyx Pharma GmbH (Schwarzenborn, Germany) for their financial support. We thank Bettina Hentschel for her help with the statistical analysis.

References

- [1] Acosta TJ, Beg MA, Ginther OJ. Aberrant blood flow area and plasma gonadotropin concentrations during the development of dominant-sized transitional anovulatory follicles in mares. *Biol Reprod* 2004; 71 (02) 637-642
- [2] Acosta TJ, Miyamoto A, Shirasuna K. et al. Blood flow: A key regulatory component of corpus luteum function in the cow. *Domest Anim Endocrinol* 2005; 29: 329-339
- [3] Acosta TJ, Hayashi KG, Ohtani M. et al. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction* 2003; 125: 759-767
- [4] Alcázar JL, Castillo G, Mínguez JÁ. et al. Endometrial blood flow mapping using transvaginal power Doppler sonography in women with postmenopausal bleeding and thickened endometrium. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003; 21: 583-588
- [5] Aslan M, Kucukaslan I, Mulazimoglu S. et al. Quantitative software analysis of ultrasonographic textures in experimental testicular torsion. *Eur J Pediatr Surg* 2013; 23: 134-139
- [6] Bergeron LH, Nykamp SG, Brisson BA. et al. An evaluation of B-mode and color Doppler ultrasonography for detecting periovulatory events in the bitch. *Theriogenology* 2013; 79 (02) 274-283
- [7] Biermann JT. Dopplersonographische Untersuchungen zur Durchblutung des Corpus luteum, der Arteria ovarica und der Arteria uterina der Stute unter Einfluss einer postovulatorischen hCG-Behandlung [Dissertation]. Tierärztliche Hochschule Hannover; 2013
- [8] Bollwein H, Maierl J, Mayer R. et al. Transrectal color doppler sonography of the A.uterina in cyclic mares. *Theriogenology* 1998; 49: 1483-1488

- [9] Bollwein H, Weber F, Kolberg B. et al. Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology* 2002; 65: 2129-2138
- [10] Brown BW, Emery MJ, Mattner PE. Ovarian arterial blood velocity measured with Doppler ultrasonic transducers in conscious ewes. *J Reprod Fertil* 1980; 58: 295-300
- [11] Brüssow K-P, Kurth J, Vernunft A. et al. Laparoscopy guided Doppler ultrasound measurement of fetal blood flow indices during early to mid-gestation in pigs. *J Reprod Dev* 2012; 58 (02) 243-247
- [12] El-Sherry TM, Derar R, Bakry R. Changes in blood flow in ovine follicles and serum concentration of estradiol 17 beta (E2) and nitric oxide (NO) around the time of ovulation in Ossimi ewes. *Anim Reprod Sci* 2013; 138: 188-193
- [13] Ford SP, Chenault JR. Blood flow to the corpus luteum-bearing ovary and ipsilateral uterine horn of cows during the oestrus cycle and early pregnancy. *J Reprod Fertil* 1981; 62: 555-562
- [14] Ford SP, Christenson RK. Blood flow to uteri of sows during the estrous cycle and early pregnancy: Local effect of the conceptus on the uterine blood supply. *Biol Reprod* 1979; 21: 617-624
- [15] Herlt C, Stark R, Sigmarsson HL. et al. Feasibility of transabdominal Doppler sonography for studying uterine blood flow characteristics in cycling gilts. *Tierarztl Prax Ausgabe G Großtiere Nutztiere* 2018; 46 (03) 154-163
- [16] Herzog K, Voss C, Kastelic JP. et al. Luteal blood flow increases during the first three weeks of pregnancy in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2011; 75: 549-554
- [17] Kauffold J, Althouse GC. An update on the use of B-mode ultrasonography in female pig reproduction. *Theriogenology* 2007; 67: 901-911
- [18] Kauffold J, Gmeiner K, Sobiraj A. et al. Ultrasonographic characterization of the urinary bladder in sows without urinary tract infection. *Vet J* 2010; 183: 103-108

- [19] Kneitz D. Spezielle ultrasonographische Untersuchungen zur uterinen, ovariellen und follikulären Durchblutung bei der Stute im periovulatorischen Zeitraum [Dissertation]. Tierärztliche Hochschule Hannover; 2010
- [20] Köster K, Poulsen Nautrup C, Günzel-Apel A-R. A Doppler ultrasonographic study of cyclic changes of ovarian perfusion in the Beagle bitch. *Reproduction* 2001; 122: 453-461
- [21] Lamond DR, Drost M. Blood supply to the bovine ovary. *J Anim Sci* 1974; 38: 106-112
- [22] Lansbergen M. Bovine follicular and luteal blood flow during the estrus cycle. Clinical evaluation of the ultrasound Doppler technology. [Master thesis]. University of Utrecht; 2013
- [23] Magness RR, Christenson RK, Ford SP. Blood flow throughout the estrous cycle and early pregnancy in sows. *Biol Reprod* 1983; 28: 1090-1096
- [24] Moriyoshi M, Sawamura T, Yasuda M. et al. Using ultrasound for clinical observation of the porcine ovary through the course of the estrous cycle and to monitor treatment of ovarian disease. *J Reprod Dev* 1996; 42 (04) 277-282
- [25] Oxenreider SL, McClure RC, Day BN. Arteries and veins of the internal genitalia of female swine. *J Reprod Fertil* 1965; 9: 19-27
- [26] Polisca A, Zelli R, Troisi A. et al. Power and pulsed Doppler evaluation of ovarian hemodynamic changes during diestrus in pregnant and nonpregnant bitches. *Theriogenology* 2013; 79: 219-224
- [27] Ragavendra N, Chen H, Powers JE. et al. Harmonic imaging of porcine intraovarian arteries using sonographic contrast medium: initial findings. *Ultrasound Obstet Gynecology* 1997; 9: 266-270

- [28] Rathmacher RP, Anderson LL. Blood flow and progesterone levels in the ovary of cycling and pregnant pigs. *Am J Physiol* 1968; 214: 1014-1018
- [29] Rauch A, Krüger L, Miyamoto A. et al. Colour Doppler sonography of cystic ovarian follicles in cows. *J Reprod Dev* 2008; 54: 447-453
- [30] Schnurrbusch U, Bergfeld J, Brüssow K-P. et al. Diagram for ovarian assessment in swine. *Mh Vet Med* 1981; 36: 811-815
- [31] Scholbach T, Girelli E, Scholbach J. Dynamic tissue perfusion measurement: novel tool in follow-up of renal transplants. *Transplantation* 2005; 79: 1711-1716
- [32] Scholbach T, Herrero I, Scholbach J. Dynamic color Doppler sonography of intestinal wall in patients with Crohn disease compared with healthy subjects. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 39: 524-528
- [33] Taylor KJW, Burns PN, Wells PNT. et al. Ultrasound Doppler flow studies of the ovarian and uterine arteries. *Br J Obstet Gynaecol* 1985; 92: 240-246
- [34] Wein S. Doppler-sonographische Untersuchungen zur ovariellen Durchblutungsrate bei Stuten in Abhängigkeit vom Zyklus [Dissertation]. Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig; 2003

4 Diskussion

Schon vormals wurde untersucht, ob das Ovar des Schweines zyklusabhängig perfundiert wird. Die dabei verwendeten, in der Regel invasiven Methoden, d.h. operativ platzierte elektromagnetische Blutflusssonden (MAGNESS et al. 1983) oder applizierte radioaktive Substanzen (RATHMACHER und ANDERSON 1968; FORD et al. 1982), erweisen sich dazu grundsätzlich als praktikabel. Ziel dieser Studie war es, die Durchführbarkeit eines nicht-invasiven Verfahrens - der transabdominalen farbkodierten Doppler-Sonographie - zur Untersuchung der ovariellen Perfusion bei lebenden Jungsauen zu testen. Gleichzeitig war Ziel dieser Studie zu untersuchen, wie sich die ovarielle Durchblutung zyklusabhängig verhält.

Die Jungsauen wurden über einen Zeitraum von zwei aufeinander folgenden Zyklen B-Mode sonographisch untersucht. Im ersten Zyklus wurde die Ovulation der Jungsauen hormonell synchronisiert, um im darauffolgenden zweiten, spontanen Zyklus dopplersonographische Untersuchungen an diesen Jungsauen in annähernd identischem Zyklusstadium durchführen zu können. Die in dieser Studie mittels B-Mode Sonographie erhobenen sonographischen Befunde stimmen weitestgehend mit den Ergebnissen vorheriger Untersuchungen der porzinen Follikeldynamik überein (RYAN et al. 1994). Zyklusabhängig konnten Follikel unterschiedlicher Größe (<3 - ≥ 5 mm) dargestellt werden. Im Gegensatz zu Untersuchungen von KNOX und ALTHOUSE (1997), die maximale CL Durchmesser von 10-12 mm im Diöstrus ermittelten, wiesen die CL in dieser Studie eine maximale Größe von $7,94 \pm 0,55$ mm auf. Abweichungen sind möglicherweise auf differierende Untersuchungsmethoden und Ultraschalltechnik zurück zu führen. Die in dieser Arbeit detektierten singulären Zysten wurden als Corpus luteum Zysten interpretiert, da sie eine sonographisch darstellbare, verdickte Wand und ein anechogenes Lumen mit einem Durchmesser bis zu ca. 2 cm aufwiesen (KAUFFOLD und ALTHOUSE 2007).

Grundsätzlich erwies sich die transabdominale farbkodierte Doppler-Sonographie als geeignet, um die ovarielle Perfusion zu analysieren. Während einzelner Untersuchungen führten Darmschlingen oder eine stark gefüllte Harnblase zu einer teilweisen oder vollständigen Verlegung ovarieller Strukturen. Des Weiteren sorgte Gas und vermutlich auch fester Kot in einzelnen Darmabschnitten zu einer Schallauslöschung. Ähnliches beobachteten SOEDE et al. bei transrektalen Untersuchungen des Genitaltrakts (1992). Durch massieren des Abdomens und/oder

verstärktes Andrücken des Schallkopfes an die Bauchwand konnten derartige Artefakte allerdings in allen Fällen eliminiert werden.

Farbkodierte Doppler Signale konnten zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung am Ovar detektiert werden. Dies deckt sich mit den Untersuchungen der Studie von WEIN (2003) bei Stuten. Von den analysierten ovariellen Arealen waren der Hilus, das Stroma, CL und CL Zysten Doppler positiv, während sich Follikel Doppler negativ darstellten. Im Gegensatz dazu konnten in Studien bei Kühen und Stuten Dopplersignale auch im Bereich der Follikelwand ermittelt werden (ACOSTA et al. 2003; ACOSTA et al. 2004). Wie schon vormals bei Kühen mittels invasiver Messungen beobachtet (FORD und CHENAULT 1981), war die Blutflussgeschwindigkeit ovarieller Gefäße östrischer Jungsauen niedrig. In dieser Studie mussten die Messungen aufgrund wiederholter Lokomotion und Lautäußerungen der Jungsauen mit hohen maximalen Flussgeschwindigkeiten (25-83 cm/s) und folglich hohen PRFs durchgeführt werden, um diese Bewegungsartefakte zu kompensieren und etwaige falsche Messwerte zu vermeiden. Deshalb konnten keine niedrigen Flussgeschwindigkeiten, wie in Follikelwänden zu erwarten, erfasst werden. Im Gegensatz zu Schweinen stehen Kühe und Stuten während der sonographischen Untersuchung überwiegend ruhig, wodurch mit niedrigen PRFs gearbeitet werden kann und niedrige Blutflussgeschwindigkeiten zu detektieren sind (VIANA et al. 2013).

Anders als bei den oben genannten Studien bei Rind und Stute (ACOSTA et al. 2003; ACOSTA et al. 2004), in denen transrektal untersucht wurde, erfolgten die Doppleruntersuchungen in dieser Studie transabdominal. Während bei transrektalem Ultraschall „das Objekt des Interesses“ mehr oder weniger direkt in Schallkopfnähe liegt, mussten die Schallwellen in dieser Studie mehrere Gewebsschichten „überwinden“, um zum Ovar zu gelangen. Dadurch mag es zur Abschwächung oder zum „Verbrauch“ von Doppler-Signalen gekommen sein, so dass vor allem langsame Blutflussgeschwindigkeiten nicht oder nur schwer darzustellen waren. Dennoch wurde der transabdominale Zugang in dieser Studie bewusst gewählt, obgleich transrektale Untersuchungen beim Schwein möglich sind (MORIYOSHI et al. 1996; KNOX und ALTHOUSE 1997) und bisweilen auch präferiert werden (YUN et al. 2018). Es waren allein Gründe der Praktikabilität, die zur Wahl der transabdominalen Sonographie in dieser Studie führten. Die transrektale Sonographie wird schlechter

als die transkutane toleriert. Sie führt zu Unbehagen, auf welches untersuchte Sauen mit vermehrten Abwehrbewegungen reagieren. Niedrige Blutflussgeschwindigkeiten wären in diesem Fall noch schlechter oder nicht zu detektieren gewesen und durch eine aufregungsbedingte etwaige Steigerung der Herzfrequenzen Messfehler aufgetreten.

Die in dieser Studie mittels Farbdoppler dargestellten Gefäßstrukturen, vor allem im Bereich des Hilus, konnten keiner der das Ovar versorgenden Arterien bzw. Venen (*A./V. ovarica*, *A./V. uterina* und *A./V. vaginalis*) zugeordnet werden. Gegensätzliches wurde bei Stuten (BÜHLMAYER 1999; BOLLWEIN et al. 2002) beobachtet, bei denen Untersuchungen transrektal erfolgten. Dort gelang es, die detektierten Flusssignale den Hauptversorgungsgefäßen der Ovarien zuzuordnen. Grund für die fehlende Zuordnung in dieser Studie wird sein, dass transabdominal untersucht wurde. Dadurch war es nicht möglich, den Schallkopf direkt auf zu untersuchende Gefäße zu platzieren. Hinzu kommt, dass die genannten Blutgefäße beim Schwein sehr gewunden sind und vielfach Anastomosen untereinander ausbilden (OXENREIDER et al. 1965), so dass eine anatomische Zuordnung erschwert bzw. unmöglich ist.

In dieser Studie wurden die Blutflussparameter vmix, Amix, Rlvmix und Plvmix ermittelt. KÖSTER et al. (2001) und WEIN (2003) verwendeten selbige Parameter in ähnlicher Kombination, um die ovarielle Durchblutung von Hündinnen bzw. Stuten zu untersuchen. Oben genannte Parameter fanden auch in der Arbeit von HERLT et al. (2018) Verwendung, um den Blutfluss des Uterus von Jungsauen zu charakterisieren. Bei HERLT et al. (2018) wurde allerdings zusätzlich die Blutflussintensität bestimmt. Die Blutflussintensität verhält sich proportional zur perfundierten Fläche und Blutflussgeschwindigkeit (SCHOLBACH et al. 2004). Die perfundierte Fläche ist mittels einer definierten „Region of Interest“ (ROI) in ihrer Größe festzulegen. Wann immer Blutflussintensitäten zu ermitteln sind, bedarf es der vorherigen Definition einer ROI. Solche standardisierten ROIs waren in dieser Studie nicht zu definieren, da die Morphologie der Ovarien in Abhängigkeit von Anzahl, Größe und Art der Funktionskörper während des Sexualzyklus stark variierte. Es war deshalb notwendig, die zu untersuchende Fläche (Ovar und Hilus) zu jedem Untersuchungszeitpunkt manuell untersuchungs- und tierindividuell festzulegen.

MAGNESS et al. (1983) bestimmten das Blutflussvolumen der Ovarien von Sauen täglich über einen gesamten Zyklus, indem sie elektromagnetische Blutflusssonden an eine nach dem Zufallsprinzip ausgewählte Ovararterie platzierten. Auf die Bestimmung des Blutflussvolumens mittels Farbdoppler wurde in dieser Arbeit verzichtet, da dazu die Kenntnis der Blutflussgeschwindigkeit und des Gefäßdurchmessers notwendig gewesen wäre (RISSE 2011). Durchmesser ovarieller Gefäße waren in dieser Studie nicht zu ermitteln, da transabdominal untersucht wurde (siehe oben), die Gefäßdurchmesser klein sind und die Gefäße gewunden verlaufen.

Die Parameter vmix und Amix wiesen einen ähnlichen Trend im Verlauf des Zyklus auf. Vmix als auch Amix waren im Proöstrus relativ hoch und im Östrus sehr niedrig. Im Metöstrus stiegen sie an, erreichten höchste Werte im mittleren Diöstrus, um dann wieder kontinuierlich abzunehmen. Werden alle für die jeweiligen Zyklusphasen ermittelten Werte zusammengefasst und gemittelt, waren vmix und Amix im Östrus am niedrigsten und im Diöstrus am höchsten. Ähnliches beobachteten MAGNESS et al. (1983) für das Blutflussvolumen des Ovars bei Sauen und BROWN et al. (1980), die Blutflussgeschwindigkeiten des Ovars bei Schafen bestimmten. Anders verhielt es sich in einer Studie zur periovulatorischen Perfusion des Ovars bei Hündinnen (BERGERON 2013), in der eine definierte Fläche zu analysieren war. Die Perfusion nahm schon während der Ovulation signifikant zu, da die Luteinisierung präovulatorischer Follikel bei Hündinnen, anders als bei der Sau, schon vor der Ovulation einsetzt (PHEMISTER et al. 1973; CONCANNON et al. 1977).

Die Widerstandsindizes Rlvmix und Plvmix zeigten einen inversen Verlauf zu oben beschriebenen Parametern vmix und Amix. Beide Parameter wiesen im Östrus die höchsten und im mittleren Diöstrus die niedrigsten Werte auf. Der inverse Verlauf lässt sich auch anhand signifikant negativer Korrelationen zwischen Amix und Rlvmix sowie Plvmix (mit Ausnahme Proöstrus) ablesen. Ähnliches wurde bei der Stute beobachtet (WEIN 2003).

Die in dieser Studie beobachtete Zyklusabhängigkeit der analysierten Perfusionsparameter deckt sich mit den Ergebnissen der Untersuchung von HERLT et al. (2018) zu Perfusionscharakteristika des Uterus der Jungsau. Auch bei HERLT et al. (2018) wiesen Rlvmix und Plvmix einen entgegengesetzten Verlauf zu vmix und Amix auf. Im Gegensatz zu dieser Studie waren Amix und vmix bei HERLT et al.

(2018) jedoch im Proöstrus und Östrus hoch, während beide Parameter im Diöstrus niedrige Werte erreichten. Diese Diskrepanz wird zum Teil methodischen Ursprungs sein. Die in der Studie von HERLT et al. (2018) gewonnenen Ergebnisse basieren überwiegend auf Perfusionsmessungen von uterinen Gefäßen zwischen den Uterusschlingen, d.h. im *Ligamentum latum uteri*. Diese Gefäße dilatieren unter Einfluss von Östrogenen, die im Proöstrus und Östrus vermehrt gebildet werden und perfusionsfördernd sind (FORD und CHRISTENSON 1979). Im Gegensatz dazu waren vmix und Amix in dieser Studie niedrig, da Dopplersignale nur aus dem Hilusbereich, aber nicht von wachsenden und präovulatorischen Follikeln zu empfangen waren. Die Ovarperfusion wurde in dieser Studie jedoch als Summe der perfundierten Areale des Hilus, Ovarstromas und der jeweils präsenten Funktionskörper ermittelt. Bezogen auf die analysierte Fläche überwogen Areale mit Follikeln, so dass eine etwaig höhere Durchblutung des Ovarhilus durch nicht-perfundierte Follikel maskiert wurde. Neben genannten methodischen Gründen mag es dafür auch biologische geben, die hormonellen Ursprungs sind. Sauen (OXENREIDER et al. 1965), aber auch Kühe (FORD und CHENAULT 1981), weisen eine Vielzahl von Anastomosen zwischen *A. ovarica* und *A. uterina* auf. Die Richtung des Blutflusses dieser Anastomosen variiert hormonabhängig, wie bei Kühen nachgewiesen wurde (FORD und CHENAULT 1981). So fließt Blut in größeren Volumina im Proöstrus, unter Einfluss von Östrogenen, in Richtung Uterus, während der Blutfluss in der Lutealphase in Richtung Ovar dirigiert ist (FORD und CHENAULT 1981), da das dann vorherrschende Progesteron zur Vasokonstriktion der uterinen Arterie führt (FORD und CHRISTENSON 1979). Nach FORD und CHENAULT (1981) ist zu postulieren, dass die uterine Arterie im Diöstrus an der Versorgung der CL beteiligt ist (FORD und CHENAULT 1981). Diese Vermutung wird durch Beobachtungen von LAMOND und DROST (1974) bestätigt, die feststellten, dass die Gefäßdurchmessers eines Astes der *A. ovarica* als auch der das Ovar versorgenden Anastomose zur *A. uterina* bei Kühen im Diöstrus vergrößert ist. Als weiteres Indiz der beschriebenen Flussrichtungsänderung mag gelten, dass sowohl bei Kühen (FORD und CHENAULT 1981) als auch Sauen (MAGNESS et al. 1983) eine signifikante Erhöhung des Blutflussvolumens während der Gelbkörperphase auftritt. Ferner ist bekannt, dass die Gelbkörperbildung mit umfangreicher Angiogenese einhergeht (MIYAMOTO et al. 2005), die gleichfalls die in dieser Studie beobachteten hohen vmix und Amix Werte im Diöstrus erklären könnte.

In der Mitte des Diöstrus kommt es zur Freisetzung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ aus dem porzinen Endometrium (SCHNURRBUSCH und HÜHN 1994). $\text{PGF}_{2\alpha}$ stimuliert die Produktion und Freisetzung von Stickoxid (NO) aus großen, den Gelbkörper umgebenden Arteriolen (MIYAMOTO et al. 2005). NO wirkt vasodilatierend und trägt somit zu einer Erhöhung des Blutflusses der Gelbkörper bei. $\text{PGF}_{2\alpha}$ und der erhöhte Blutfluss bewirken nachfolgend eine Freisetzung der Vasokonstriktoren Endothelin-1 (ET-1) und Angiotensin II (Ang II) aus Mikrokapillaren innerhalb des Gelbkörpers. Diese Konstriktoren unterdrücken wiederum die Sekretion von Progesteron aus angrenzenden lutealen Zellen und induzieren eine Vasokonstriktion lutealer Arteriolen, wodurch die funktionelle Luteolyse eingeleitet wird. Daraus folgt die Reduktion des lutealen Blutflusses und der Beginn der strukturellen Luteolyse (MIYAMOTO et al. 2005). Es lässt sich schließen, dass die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierte Luteolyse ursächlich für die Abnahme von vmix und Amix im Diöstrus dieser Studie ist. Oben genannte Zusammenhänge korrespondieren mit früheren Untersuchungen beim Schwein, in denen festgestellt wurde, dass der luteale Blutfluss nicht vor Einsetzen der funktionellen Luteolyse abnimmt (RATHMACHER und ANDERSON 1968).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich die transabdominale farbkodierte Doppler-Sonographie, wie schon in der Arbeit von HERLT et al. (2019) am Uterus gezeigt, zur Charakterisierung des ovariellen Blutflusses während des Sexualzyklus der Jungsau eignet. Es konnte festgestellt werden, dass die ovarielle Perfusion im Diöstrus höher als in allen anderen Abschnitten des Sexualzyklus ist. Da die Jungsaue während der Untersuchung zwar immobilisiert (in einem Stand fixiert) aber nicht anästhesiert waren, hat die farbkodierte Doppler-Sonographie Potenzial als praxistaugliche Methode für ausgewählte Fragestellungen. Beim Rind fand die farbkodierte Doppler-Sonographie u.a. zur Beurteilung der Funktionalität bestehender Gelbkörper Anwendung (HERZOG et al. 2010). Dafür mag auch beim Schwein Bedarf bestehen, da z.B. die saisonale Infertilität auch auf Gelbkörperinsuffizienz zurückgeführt wird (PELTONIEMI und VIROLAINEN 2006). Zudem mag die farbkodierte Doppler-Sonographie zur besseren Charakterisierung ovarieller Zysten Anwendung finden. So wurde bei Kühen gezeigt, dass die Beurteilung der Perfusion der Zystenwände diagnostisch aussagekräftiger ist als deren Dickenbeurteilung (MATSUI und MIYAMOTO 2009). Möglicherweise sind dann therapeutische Maßnahmen auch bei Sauen mit polyzystischer Ovardegeneration

und bisher infauster Prognose möglich. Bevor sich jedoch pathologischen Zuständen gewidmet wird, sind Referenzwerte zu definieren. Dafür mag notwendig sein, diese Studie an einer größeren Tieranzahl zu wiederholen und mit hormonanalytischen Untersuchungen zu kombinieren, wie es ähnlich bereits bei Stuten (GINTHER et al. 2007) und Kühen (HERZOG et al. 2010) erfolgte.

5 Zusammenfassung

Rosa Stark

Charakterisierung der ovariellen Perfusion zyklischer Jungsauen mittels transabdominaler farbkodierter Doppler-Sonographie

Klinik für Kleintiere der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im November, 2019

56 Seiten, 1 Publikation, 8 Abbildungen, 2 Tabellen, 101 Literaturangaben

Schlüsselwörter: farbkodierte Doppler-Sonographie, ovarielle Perfusion, Jungsau

Einleitung: In den letzten Jahren wurde die farbkodierte Doppler-Sonographie als diagnostisches Verfahren zur Charakterisierung der ovariellen Perfusion von Kühen, Stuten und Hündinnen vielfach angewandt. Untersuchungsergebnisse dieser Studien zeigten nicht nur zyklusabhängige Veränderungen, sondern erwiesen sich ferner als geeignet, um die Ursache von Ovarpathologien zu analysieren. Im Gegensatz dazu wurden in der porcinen Reproduktionsmedizin bisher keine dopplersonographischen Untersuchungen der Ovarien durchgeführt. **Ziele der Untersuchungen:** Das Ziel dieser Arbeit war es, den ovariellen Blutfluss von Jungsauen mittels transabdominaler farbkodierter Doppler-Sonographie im Verlauf eines Sexualzyklus zu analysieren. **Tiere, Material und Methoden:** Die Ovarien von 15 geschlechtsreifen, hormonell synchronisierten Jungsauen wurden im darauf folgenden spontanen Zyklus täglich in einem mobilen Stand transabdominal mittels farbkodierter Doppler Ultraschallsonographie untersucht. Es wurden Videosequenzen von mindestens 4 Sekunden (s) aufgezeichnet. Diese wurden im Anschluss mit Hilfe der Software PixelFlux® innerhalb einer definierten „Region of Interest“ analysiert. Anhand der Anzahl, Farbe und Intensität der Pixel wurden nachfolgend genannte Blutflussparameter berechnet: Blutflussgeschwindigkeit, perfundierte Fläche und die Doppler-Indizes Resistenz- und Pulsatilitätsindex. Für die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse wurde SPSS verwendet. Aufgrund variierender Längen der Zyklusphasen (d.h. Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus) der Jungsauen wurde der Tag der Ovulation als Tag „2“ des Sexualzyklus deklariert, die Phasen daran ausgerichtet und die dann jeweils verfügbaren Werte zwischen den Zyklustagen -3 - 17 analysiert. Die Ergebnisse wurden nach Bonferroni korrigiert und

mittels Friedman und Wilcoxon Test untersucht. Auf Korrelationen zwischen den einzelnen Blutflussparametern wurde mittels Pearson oder Spearman Korrelationskoeffizienten getestet. **Ergebnisse:** Der ovarielle Blutfluss war zu jedem Untersuchungszeitpunkt messbar. Alle Blutflussparameter wiesen einen zyklusabhängigen Verlauf auf. Die Blutflussgeschwindigkeit und die durchblutete Fläche waren im Diöstrus am höchsten und im Östrus am niedrigsten. Diese Parameter korrelierten mittel bis stark positiv im Proöstrus und Östrus ($r: 0,59 - 0,88$; $p < 0,05$). Der Resistenz- und Pulsatilitätsindex zeigten beide einen umgekehrt proportionalen Verlauf zu den zuvor genannten Blutflussparametern und korrelierten mittel bis stark negativ in einzelnen Zyklusabschnitten mit diesen ($r: -0,58 - -0,76$; $p < 0,05$). Die Doppler-Indizes korrelierten untereinander im Östrus und Diöstrus stark positiv ($r: 0,77 - 0,93$; $p < 0,05$). **Schlussfolgerungen:** Es ist zu schlussfolgern, dass die transabdominale farbkodierte Doppler-Sonographie ein geeignetes Verfahren zur Untersuchung der ovariellen Perfusion von Jungsauen ist. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich der ovarielle Blutfluss von Jungsauen zyklusabhängig ändert und im Diöstrus am höchsten ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit mögen helfen, etwaig perfusionsrelevante Erkrankungen des Ovars beim Schwein, wie Gelbkörperinsuffizienz, zu charakterisieren.

6 Summary

Rosa Stark

Characterization of ovarian perfusion in cyclic gilts by transabdominal color Doppler sonography

Clinic for Ruminants and Swine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted November, 2019

56 pages, 1 publication, 8 figures, 2 tables, 101 references

Keywords: Color Doppler ultrasonography, ovarian perfusion, gilt

Introduction: In recent years, color Doppler ultrasonography has been frequently used as a diagnostic tool for the characterization of ovarian perfusion in cows, mares and bitches. Results of these studies not only showed cycle dependent perfusion characteristics, but also proved useful in the analysis of ovarian pathologies. In porcine medicine, however, investigations of the ovaries using color Doppler sonography have yet not been conducted. **Objective:** The objective of this study was to determine the ovarian blood flow in gilts by transabdominal color Doppler ultrasonography throughout one estrous cycle. **Material and methods:** The ovaries of 15 pubertal, hormonally synchronized gilts were transabdominally scanned daily during the following spontaneous estrous cycle using color Doppler ultrasonography while being confined in a mobile crate. Video sequences of at least 4 seconds (s) were recorded. These sequences were then analyzed using PixelFlux[®] software within a pre-defined 'Region of Interest'. Based on number, color and intensity of pixels, the following blood flow parameters were calculated: blood flow velocity, perfused area and the Doppler indices for resistance and pulsatility. For statistical analysis, SPSS was used. Due to variations in the length of the phases of the estrous cycle (i.e. proestrus, estrus, metestrus and diestrus) in the gilts, the day of ovulation was declared as day '2' of the estrous cycle. The phases were then aligned accordingly and the available data between days -3 -17 analyzed. The results were corrected using the Bonferroni method and examined using Friedman and Wilcoxon tests. Pearson and Spearman correlation coefficients were employed to test for correlation between the blood flow parameters. **Results:** Ovarian blood flow was always measurable at each examination. All blood flow parameters showed estrous

Summary

cycle dependent patterns. Blood flow velocity and perfused area were highest in diestrus and lowest in estrus. These parameters showed a medium to strongly positive correlation in proestrus and estrus ($r: 0.59 - 0.88; p < 0.05$). Resistance and pulsatility indices were both inversely proportional to, and correlated medium to strongly negative with the aforementioned blood flow parameters at several stages of the estrous cycle ($r: -0.58 - -0.76; p < 0.05$). Both indices correlated strongly positive in estrus and diestrus ($r: 0.77 - 0.93; p < 0.05$). **Conclusion:** In conclusion, results show that transabdominal color Doppler ultrasonography is an appropriate method to examine the ovarian blood flow in gilts. It was proven that the ovarian perfusion shows a dependency on the stage of the estrous cycle and is highest in diestrus. The results obtained may aid in the characterization of perfusion based ovarian diseases in swine such as corpus luteum insufficiency.

7 Literaturverzeichnis

Acosta TJ, Beg MA, Ginther OJ. Aberrant blood flow area and plasma gonadotropin concentrations during the development of dominant-sized transitional anovulatory follicles in mares. *Biol Reprod.* 2004;71(2):637-42.

Acosta TJ, Hayashi KG, Ohtani M, Miyamoto A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction.* 2003;125(5):759-67.

Acosta TJ, Yoshizawa N, Ohtani M, Miyamoto A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F2a injection in cow. *Biol Reprod.* 2002;66(3):651-8.

Battaglia C, Artini PG, D'Ambrogio G, Genazzani, Genazzani AD, Genazzani AR. The role of color doppler imaging in the diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;172(1):108-13.

Bergeron LH, Nykamp SG, Brisson BA, Madan P, Gartley CJ. An evaluation of B-mode and color Doppler ultrasonography for detecting periovulatory events in the bitch. *Theriogenology.* 2013;79(2):274-83.

Biermann JT. Dopplersonographische Untersuchungen zur Durchblutung des Corpus luteum, der Arteria ovarica und der Arteria uterina der Stute unter Einfluss einer postovulatorischen hCG-Behandlung [Dissertation med. vet]. Hannover: TiHo Hannover; 2013.

Blaich U. Dopplerultrasonographische Untersuchungen zur uterinen Hämodynamik des Pferdes unter Berücksichtigung sexualzyklischer und degenerativ-endometrialer Einflüsse [Dissertation med. vet]. Hannover: TiHo Hannover; 1999.

Bolarín A, Roca J, Rodríguez-Martínez H, Hernández M, Vázquez JM, Martínez EA. Dissimilarities in sows' ovarian status at the insemination time could explain differences in fertility between farms when frozen-thawed semen is used. *Theriogenology*. 2006;65(3):669-80.

Bollwein H, Kolberg B, Stolla R. The effect of exogenous estradiol benzoate and altrenogest on uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*. 2004;61(6):1137-46.

Bollwein H, Maierl J, Mayer R, Stolla R. Transrectal Color Doppler Sonography of the A. uterina in cycling mares. *Theriogenology*. 1998;49(8):1483-8.

Bollwein H, Mayer R, Weber F, Stolla R. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*. 2002;57(8):2043-51.

Bollwein H, Weber F, Kolberg B, Stolla R. Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*. 2002;57(8):2129-38.

Botero O, Martinat-Botté F, Bariteau F. Use of ultrasound scanning in swine for detection of pregnancy and some pathological conditions. *Theriogenology*. 1986;26(3):267-78.

Boye H. Vergleichende Untersuchungen über die arterielle Gefäßversorgung des Uterus von Wild- und Hausschwein. *J Anim Breed Genet*. 1956;67(3):259-96.

Brännström M, Zackrisson U, Hagström HG, Josefsson B, Hellberg P, Granberg S, Collins WP, Bourne T. Preovulatory changes of blood flow in different regions of the human follicle. *Fertil Steril*. 1998;69(3):435-42.

Brockhan-Lüdemann M. Farbdopplersonographische Untersuchungen zur Funktion des bovinen Corpus luteum [Dissertation med. vet]. Hannover: TiHo Hannover; 2009.

Brown BW, Emery MJ, Mattner PE. Ovarian arterial blood velocity measured with Doppler ultrasonic transducers in conscious ewes. J Reprod Fertil. 1980;58(2):295-300.

Brozos CN, Pancarci MS, Valencia J, Beindorff N, Tsousis G, Kioussis E, Bollwein H. Effect of oxytocin infusion on luteal blood flow and progesterone secretion in dairy cattle. J Vet Sci. 2012;13(1):67-71.

Brüssow KP, Kurth J, Vernunft A, Becker F, Tuchscherer A, Kanitz W. Laparoscopy guided Doppler ultrasound measurement of fetal blood flow indices during early to mid-gestation in pigs. J Reprod Dev. 2012;58(2):243-7.

Bühlmeyer M. Farbdopplersonographische Untersuchung der A. uterina und der A. ovarica der Stute im Verlauf spontaner und hormonell induzierter Ovulationen [Dissertation med. vet]. München: Ludwig-Maximilians Univ. München; 1999.

Cartee RE, Powe TA, Ayer RL. Ultrasonographic detection of pregnancy in sows. Mod Vet Pract. 1985;23-6.

Cech S, Dolezel R. Treatment of ovarian cysts in sows – a field trial. Vet Med-Czech. 2007;52:413-18.

Cohen S, Mulder EJ, van Oord AC, Jonker FH, van der Weiden GC, Taverne MA. Non-invasive monitoring of fetal heart rate during the last ten days of gestation in sows. Am J Vet Res. 1997;58(11):1285-90.

Literaturverzeichnis

Concannon P, Hansel W, McEntee K. Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. Biol Reprod. 1977;17(4):604-13.

Da Silva CLA, Laurensen BFA, Knol BF, Kemp B, Soede NM. Validation of transrectal ultrasonography for assessment of corpora lutea characteristics in pregnant sows and its relationship with litter characteristics at birth. Transl Anim Sci. 2017;1:507-17.

De Resnis F, Bigliardi E, Parmigiani E, Peters AR. Early diagnosis of pregnancy in sows by ultrasound evaluation of embryo development and uterine echotexture. Vet Rec. 2000;147(10):267-70.

Dickey RP, Hower JF, Matulich EM, Brown GT. Effect of standing on non-pregnant uterine blood flow. Ultrasound Obstet Gynecol. 1994;4(6):480-7.

Dickey RP. Doppler ultrasound investigation of uterine and ovarian flow in infertility and early pregnancy. Hum Reprod Update. 1997;3(5):467-503.

Doppler JC. Über das farbige Licht der Dopplersterne und einiger anderer Gestirne des Himmels. Abh königl böhm Ges Wiss 1843;2:465-82.

Ford SP, Chenault JR. Blood flow to the corpus luteum-bearing ovary and ipsilateral uterine horn of cows during the oestrus cycle and early pregnancy. J Reprod Fertil. 1981;62(2):555-62.

Ford SP, Christenson RK. Blood flow to uteri of sows during the estrous cycle and early pregnancy: local effect of the conceptus on the uterine blood supply. Biol Reprod. 1979;21(3):617-24.

Ford SP, Reynolds LP, Magness RR. Blood flow to the uterine and ovarian vascular beds of gilts during the estrous cycle or early pregnancy. Biol Reprod. 1982;27(4):878-85.

Fraunholz J, Kähn W, Leidl W. Sonography for pregnancy diagnosis of swine – comparison between transrectal and transcutaneous procedures. Mh Vet Med. 1989;44:425-30.

Freeman SL, Russo M, England GC. Uterine artery blood flow characteristics assessed during oestrus and the early luteal phase of pregnant and non-pregnant bitches. Vet J. 2013;197(2):205-10.

Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Utt MD, Beg MA. Luteal blood flow and progesterone production in mares. Anim Reprod Sci. 2007;99(1-2):213-20.

Goswamy RK, Steptoe PC. Doppler ultrasound studies of the uterine artery in spontaneous ovarian cycles. Hum Reprod. 1988;3(6):721-6.

Hartmann D, Honnens A, Piechotta M, Lüttgenau J, Niemann H, Rath D, Bollwein H. Effects of a protracted induction of parturition on the incidence of retained placenta and assessment of uterine artery blood flow as a measure of placental maturation in cattle. Theriogenology . 2013;80(3):176-84.

Hauer S. Farbdopplersonographie der A. uterina und des Corpus luteum während der Frühgravidität und der mechanisch verlängerten Lutealphase der Stute [Dissertation med. vet]. München: Ludwig-Maximilians Univ. München; 2011.

Herlt C, Stark R, Sigmarsson HL, Kauffold J. Feasibility of transabdominal Doppler sonography for studying uterine blood flow characteristics in cycling gilts. Tierarztl Prax Ausg G Nutztiere. 2018;46(3):154-63.

Herzog K, Bollwein H. Application of Doppler Ultrasonography in cattle reproduction. *Reprod Domest Anim.* 2007;42(2):51-8.

Herzog K, Brockhan-Lüdemann M, Kaske M, Beindorff N, Paul V, Niemann H, Bollwein H. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology.* 2010;73(5):691-7.

Herzog K, Voss C, Kastelic JP, Beindorff N, Paul V, Niemann H, Bollwein H. Luteal blood flow increases during the first three weeks of pregnancy in lactating dairy cows. *Theriogenology.* 2011;75(3):549-54.

Inaba T, Nakazima Y, Matsui N, Imori T. Early pregnancy diagnosis in sows by ultrasonic linear electronic scanning. *Theriogenology.* 1983;20(1):97-101.

Irie M, Ohmoto K, Kumagaya S. Diagnosis of pregnancy in pigs by real time ultrasonic B-mode scan. *Jpn J Zootech Sci.* 1984;55(6):381-8.

Jonker FH. Fetal death: comparative aspects in large domestic animals. *Anim Reprod Sci.* 2004;82-83:415-30.

Kauffold J, Althouse GC. An update on the use of B-mode ultrasonography in female pig reproduction. *Theriogenology.* 2007;67(5):901-11.

Kauffold J, Gmeiner K, Sobiraj A, Richter A, Failing A, Wendt M. Ultrasonographic characterization of the urinary bladder in sows without urinary tract infection. *Vet J.* 2010;183(1):103-8.

Kauffold J, Hörügel K, Beynon N, Sobiraj A. Ultrasonographische Charakterisierung von Uteri und Ovarien fertiler Altsauen nach dem Absetzen und in der darauf folgenden Brunst. *Tierärztl Prax Ausg G.* 2006;34(01):35-9.

Literaturverzeichnis

Kauffold J, Rautenberg T, Gutjahr S, Richter A, Sobiraj A. Ultrasonographic characterization of the ovaries in non-pregnant first served sows and gilts. *Theriogenology*. 2004;61(7-8):1407-17.

Kauffold J, Rautenberg T, Hoffmann G, Beynon N, Schellenberg I, Sobiraj A. A field study into the appropriateness of transcutaneous ultrasonography in the diagnoses of uterine disorders in reproductively failed pigs. *Theriogenology*. 2005;64(7):1546-58.

Kauffold J, Rautenberg T, Richter A, Waehner M, Sobiraj. Ultrasonographic characterization of the ovaries and the uterus in prepubertal and pubertal gilts. *Theriogenology* . 2004;61(9):1635-48.

Kauffold J, Richter A, Sobiraj A. Ultrasonographische Ovar- und Uterusbefunde bei Sauen. 1. Aufl. Leipzig: 1997.

Kemp B, Soede NM. Relationship of weaning-to-estrus interval to timing of ovulation and fertilization in sows. *J Anim Sci*. 1996;74(5):944-9.

Knox RV, Althouse GC. Visualizing the reproductive tract of the female pig using real-time ultrasonography. *Swine Health Prod*. 1997;7(5):207-15.

Knox RV. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. *Domest Anim Endocrinol*. 2005;29:385-97.

Köster K, Poulsen Nautrup C, Günzel-Apel AR. A Doppler ultrasonographic study of cyclic changes of ovarian perfusion in the Beagle bitch. *Reproduction*. 2001;122(3):453-61.

Lamond DR, Drost M. Blood supply to the bovine ovary. *J Anim Sci*. 1974;38(1):106-12.

Literaturverzeichnis

Lange H. Neue Untersuchungen zur Vaskularisation des Schweineuterus [Dissertation med. vet]. Berlin: Freie Univ. Berlin; 1959.

Lansbergen M. Bovine follicular and luteal blood flow during the estrus cycle. Clinical evaluation of the ultrasound Doppler technology. [Master thesis]. Utrecht: Univ. Utrecht; 2013.

Lucy MC, Liu J, Boyd CK, Bracken CJ. Ovarian follicular growth in sows. Reprod Suppl. 2001;58:31-45.

Magness RR, Christenson RK, Ford SP. Ovarian blood Flow throughout the estrous cycle and early pregnancy in sows. Biol Reprod. 1983;28(5):1090-6.

Martinat-Botté F, Royer E, Venturi E, Boisseau C, Guillouet P, Furstoss V, Terqui M. Determination by echography of uterine changes around puberty in gilts and evaluation of a diagnosis of puberty. Reprod Nutr Dev. 2003;43(3):225-36.

Martinat-Botté F, Venturi É, Royer É, Elleboudt F, Furstoss V, Ridremont B, Driancourt MA. Selection of impubertal gilts by ultrasonography optimizes their oestrus, ovulatory and fertility responses following puberty induction by PG600. Anim Reprod Sci. 2011;124(1-2):132-37.

Martinez E, Vazquez JM, Roca J, Ruiz S. Use of real-time ultrasonic scanning for the detection of reproductive failure in pig herds. Anim Reprod Sci. 1992;29(1-2):53-9.

Matsui M, Miyamoto A. Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound: practical use for reproductive management in the cow. Vet J. 2009;181(3):232-40.

Miller GM, Breen SM, Roth SL, Willenburg KL, Rodriguez-Zas A, Knox RV. Characterization of image and labor requirements for positive pregnancy diagnosis in swine using two methods of real-time ultrasound. J Swine Health Prod. 2003;11(5):233-39.

Miyamoto A, Shirasuna K, Wijayagunawardane, M P B, Watanabe S, Hayashi M, Yamamoto D, Matsui M, Acosta TJ. Blood flow: a key regulatory component of corpus luteum function in the cow. Domest Anim Endocrinol. 2005;29(2):329-39.

Moriyoshi M, Sawamura T, Yasuda M, Nakao T, Kawata K. Using ultrasound for clinical observation of the porcine ovary through the course of the estrous cycle and to monitor treatment of ovarian disease. J Reprod Dev. 1996;42(4):277-82.

Nickel R, Schummer A, Seiferle E. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band 3. Kreislaufsystem Haut und Hautorgane. Kapitel: Eingeweidearterien der A. iliaca interna. 3. Aufl. Berlin: Parey; 1996;185.

Nissen AK, Soede NM, Hyttel P, Schmidt M, D'Hoore L. The influence of time of insemination relative to time of ovulation on farrowing frequency and litter size in sows, as investigated by ultrasonography. Theriogenology. 1997;47(8):1571-82.

Niswender GD, Moore RT, Akbar AM, Nett TM, Diekman MA. Flow of blood to the ovaries of ewes throughout the estrous cycle. Biol Reprod. 1975;13(4):381-8.

Niswender GD, Moore RT, Reimers TJ, Diekman MA, Nett TM. Blood Flow: a mediator of ovarian function. Biol Reprod. 1976;14(1):64-81.

Oxenreider SL, McClure RC, Day BN. Arteries and veins of the internal genitalia of female swine. J Reprod Fertil. 1965;9:19-27.

Peltoniemi OAT, Virolainen JV. Seasonality of reproduction in gilts and sows. Soc Reprod Fertil Suppl. 2006;62:205-18.

Phemister RD, Holst PA, Spano JS, Hopwood ML. Time of ovulation in the beagle bitch. Biol Reprod. 1973;8(1):74-82.

Polisca A, Zelli R, Troisi A, Orlandi R, Brecchia G, Boiti C. Power and pulsed Doppler evaluation of ovarian hemodynamic changes during diestrus in pregnant and nonpregnant bitches. Theriogenology. 2013;79(2):219-24.

Knox RV, Probst-Miller A. Evaluation of transrectal real-time ultrasound for use in identifying 661 sources of reproductive failure in weaned sows. J Swine Health Prod. 2004;12:71-4.

Rathmacher RP, Anderson LL. Blood flow and progesterone levels in the ovary of cycling and pregnant pigs. Am J Physiol. 1968;214(5):1014-8.

Rauch A, Krüger L, Miyamoto A, Bollwein H. Colour Doppler Sonography of Cystic Ovarian Follicles in Cows. J Reprod and Develop. 2008;54:447-53.

Risse J. Ultrasonographische Untersuchungen zur uterinen und ovariellen Hämodynamik sowie zur uterinen Kontraktionsaktivität bei der Stute unter besonderer Berücksichtigung der Besamungsfrequenz [Dissertation med. vet]. Hannover: TiHo Hannover; 2011.

Rohr S. Untersuchung zur Regulation der uterinen und ovariellen Durchblutung sowie der Expression von Stickstoffmonoxidsynthasen und Östrogenrezeptoren im Endometrium im Verlauf des Zyklus und der Frühgravidität der Stute [Dissertation med. vet]. München: Ludwig-Maximilians-Univ. München; 2003.

Ryan DP, Yaakub H, Harrington D, Lynch PB. Follicular development during early pregnancy and the estrous cycle of the sow. *Theriogenology*. 1994;42(2):623-32.

Satumora S, Kaneko Z. Ultrasonic blood rheography. Proceedings of the 3rd international conference of medical electronics; 1960; London, UK.

Schäberle W. Grundlagen. In: *Ultraschall in der Gefäßdiagnostik*. 3. Aufl. Berlin: Springer; 2010.

Schnurrbusch U, Hühn U. Sexualzyklus und Belegung. In: *Fortpflanzungssteuerung beim weiblichen Schwein*. Jena: Gustav Fischer Verlag; 1994.

Scholbach T, Dimos I, Scholbach J. A new method of color Doppler perfusion measurement via dynamic sonographic signal quantification in renal parenchyma. *Nephron Physiol*. 2004;96(4):99-104.

Scholbach T, Herrero I, Scholbach J. Dynamic color Doppler sonography of intestinal wall in patients with Crohn disease compared with healthy subjects. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004;39(5):524-8.

Scully S, Evans ACO, Carter F, Duffy P, Lonergan P, Crowe MA. Ultrasound monitoring of blood flow and echotexture of the corpus luteum and uterus during early pregnancy of beef heifers. *Theriogenology*. 2015;83(3):449-58.

Soede NM, Langendijk P, Kemp B. Reproductive cycles in pigs. *Anim Reprod Sci*. 2011;124(3-4):251-8.

Soede NM, Helmond FA, Kemp B. Periovulatory profiles of oestradiol, LH and progesterone in relation to oestrus and embryo mortality in multiparous sows using transrectal ultrasonography to detect ovulation. *J Reprod Fertil*. 1994;101(3):633-41.

Soede NM, Wetzels CC, Zondag W, de Koning MA, Kemp B. Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. J Reprod Fertil. 1995;104(1):99-106.

Soede NM, Noordhuizen JP, Kemp B. The duration of ovulation in pigs, studied by transrectal ultrasonography, is not related to early embryonic diversity. Theriogenology. 1992;38(4):653-66.

Utt MD, Johnson GL, Beal WE. The evaluation of corpus luteum blood flow using color-flow Doppler ultrasound for early pregnancy diagnosis in bovine embryo recipients. Theriogenology. 2009;71(4):707-15.

Viana JHM, Arashiro EKN, Siqueira LGB, Ghetti AM, Areas VS, Guimaraes CRB, Palhao MP, Camargo LSA, Fernandes CAC. Doppler ultrasonography as a tool for ovarian management. Anim Reprod. 2013;10(3):215-222.

von dem Bussche-Hünnefeld. Sonographische Graustufenanalyse des Uterus vom Schwein im Verlauf des Zyklus und der frühen Trächtigkeit. [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2007.

Vorhagen V. Sonographische Untersuchung von präovulatorischen Follikeln bei der Sau in Hinblick auf eine mögliche Voraussage der Ovulationsperiode [Dissertation med. vet]. Gießen: Univ. Gießen; 2015.

Wein S. Doppler-Sonographische Untersuchungen zur ovariellen Durchblutungsrate bei Stuten in Abhängigkeit vom Zyklus [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2003.

Weitze KF, Habeck O, Willmen T, Rath D. Detection of ovulation in the sow using transcutaneous sonography. Zuchthyg. 1989;24:40-2.

Literaturverzeichnis

Wünschmann F. Dopplersonographische Untersuchungen zu den Perfusionsverhältnissen am Uterus von Stuten während des Zyklus [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2007.

Yun J, Björkman S, Oliviero C, Soede N, Peltoniemi O. The effect of farrowing duration and parity on preovulatory follicular size and oxytocin release of sows at subsequent oestrus. *Reprod Domest Anim.* 2018;53(3):776-83.

Zaidi J, Campbell S, Pittrof R, Kyei-Mensah A, Shaker A, Jacobs HS, Lin Tan S. Ovarian stromal blood flow in women with polycystic ovaries-a possible new marker for diagnosis. *Hum Reprod.* 1995;10(8):1992-6.

Anhang

Publikation

Stark R, Herlt C, Sigmarsson HL, Kauffold J. Feasibility of transabdominal Doppler ultrasonography for studying ovarian blood flow characteristics in cycling gilts.

Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere. 2019; 47(2): 77-85.

Vortrag

Poser C, Stark R (2015): Untersuchung zur Perfusion von Ovar und Uterus von Jungsauen mittels Dopplersonographie. 4. Leipziger Doktorandenforum, 09.10.2015; Leipzig

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Kauffold für die Vergabe des Themas, die Bereitstellung des hervorragenden Ultraschallgerätes und die langjährige Betreuung meiner Dissertation. Des Weiteren möchte ich Dr. Sigmarsson für die Unterstützung bei allen technischen Problemen und Lösung aller digitalen Hürden danken. Weiterhin gilt ein besonderer Dank Dr. Hoops und Frau Legler für deren Mithilfe im Versuchszeitraum und seelische Unterstützung in allen Phasen der Dissertation.

Danken möchte ich vor allem den unendlich kooperativen und braven Jungsauen, ihr wart großartig! Den Mitarbeitern des Lehr- und Versuchsgutes Oberholz möchte ich ebenfalls für ihre Kooperation während der zum Teil sehr langen Stallaufenthalte danken.

Des Weiteren bin ich Frau Hentschel sehr dankbar für die statistische Beratung und das Vermögen sich in die, ihr bis dahin unbekannte, Welt der zyklischen Jungsau hinein zu versetzen.

Unendlich dankbar bin ich meiner Mitdotorandin Catherine Herlt. Ohne ihr unschlagbares Organisationstalent und ihre eiserne Disziplin wäre ich verloren gewesen. Vielen, vielen Dank liebe Catherine für die unzähligen Stunden mit Taylor Swift und dir im Schweinestall, im Büro, beim Joggen und am Telefon. Unsere daraus entstandene Freundschaft hat all die weniger schönen Phasen der Doktorarbeitszeit immens relativiert.

Lena und meiner großartigen Schwester Flora möchte ich danken für die kritische Durchsicht meiner Dissertation und vor allem für eure emotionale Unterstützung während der gesamten Doktorarbeitszeit. Meinen Eltern danke ich auch sehr für das mir entgegengebrachte Vertrauen in allen Lebensabschnitten.

Des Weiteren danke ich meiner Oma Karla für ihr jahrelanges Verständnis und ihre nie endende Fürsorge.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Stefan für seine bedingungslose Unterstützung und Liebe.